

DISEÑO DE SUPERFICIES MULTIFUNCIONALES Y ALEACIONES DE TITANIO PARA EL CONTROL Y TRATAMIENTO DE LA INFECCIÓN DE IMPLANTES OSTEOARTICULARES

Álvaro Auñón Rubio

Director Emilio Calvo Crespo

Co-director Jaime Esteban Moreno

Madrid, 2020

D. EMILIO CALVO CRESPO, DOCTOR EN MEDICINA Y CIRUGÍA,
PROFESOR TITULAR DE MEDICINA Y JEFE DEL SERVICIO DE CIRUGÍA
ORTOPÉDICA Y TRAUMATOLOGÍA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO
FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ;

CERTIFICA:

Que Don Álvaro Auñón Rubio ha realizado bajo su dirección y supervisión la tesis titulada “Diseño de superficies multifuncionales y aleaciones de titanio para el control y tratamiento de la infección de implantes osteoarticulares” con objeto de obtener el Grado de Doctor en Medicina y Cirugía.

El Presente trabajo reúne las condiciones de rigor y originalidad científica para ser presentada como tesis doctoral.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo la presente certificación en Madrid a 2 de marzo de 2020.

D. Emilio Calvo Crespo

D. JAIME ESTEBAN MORENO, DOCTOR EN MEDICINA, PROFESOR
ASOCIADO Y JEFE ASOCIADO DEL SERVICIO DE MICROBIOLOGÍA DEL
HOSPITAL UNIVERSITARIO FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ

CERTIFICA:

Que Don Álvaro Auñón Rubio ha realizado bajo su dirección y supervisión la tesis titulada “Diseño de superficies multifuncionales y aleaciones de titanio para el control y tratamiento de la infección de implantes osteoarticulares” con objeto de obtener el Grado de Doctor en Medicina y Cirugía.

El Presente trabajo reúne las condiciones de rigor y originalidad científica para ser presentada como tesis doctoral.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo la presente certificación en Madrid a 2 de marzo de 2020.

D. Jaime Esteban Moreno

La presente tesis doctoral ha sido dirigida por los doctores
Emilio Calvo Crespo y Jaime Esteban Moreno
ha sido financiada íntegramente por el Ministerio de Economía y Competitividad
del Gobierno de España, dentro del Programa estatal de Proyectos de
Investigación, Desarrollo e Innovación orientado a los Retos de la Sociedad
(MAT2013-48224-C2-1-R y MAT2013-48224-C2-2-R), proyecto beneficiario de
una ayuda para la formación del personal investigador (FPI) (BES-2014-
069007), concedida y aprovechada por el doctorando.

COMUNICACIONES A CONGRESOS

Auñón A, Aguilera Correa JJ , Conde A, Vara MA, Calvo E, Esteban J,.
Empleo de nanotubos de TiO₂ dopados con F y P cargados con gentamicina y vancomicina para prevenir la infección protésica articular causada por *S. aureus*. Congreso SECOT 2018-Valladolid

Auñón A, Eguíbar Blazquez D, Conde A, Arenas MA, De Damborenea JJ, Marín M, Esteban J, Aguilera Correa JJ. Empleo de nanotubos de TiO₂ dopados con F y P cargados con gentamicina y vancomicina para prevenir la infección protésica articular causada por *S. aureus*. Congreso SEIMC 2018-Bilbao

Auñón A, Eguibar-Blazquez D, Conde A, Arena MA, De-Damborenea JJ, Marin M, J Esteban-Moreno, Aguilera-Correa J. F-P-TiO₂ bottle-shaped nanotubular structure loaded with gentamicin and vancomycin combination as prevention of prosthetic joint infection caused by *Staphylococcus aureus*: an in vivo rabbit model. ECCMID Congress- Madrid 2018

PUBLICACIONES RELACIONADAS CON LA TESIS

Auñón Á, Esteban J, Doadrio A, Boiza-Sánchez M, Mediero A, Eguibar-Blázquez, Cordero-Ampuero J, Conde A(8), Arenas MÁ, de-Damborenea JJ, Aguilera-Correa JJ. *Staphylococcus aureus* prosthetic joint infection is prevented by a fluorine- and phosphorus-doped nanostructured Ti-6Al-4V alloy loaded with gentamicin and vancomycin. J Orthop Res. 2019 Oct 14.

“Si se cree
y se trabaja,
se puede”

D.P.S

RESUMEN

La infección es una de las complicaciones más devastadoras de la cirugía ortopédica y la traumatología. Una de las estrategias propuestas para prevenirla es la antibioterapia local. Este estudio evalúa la capacidad en de liberación de antibiótico, citocompatibilidad in vitro y efectividad in vivo, de una aleación de Ti_6Al_4V , con una nanoestructura con forma de botella(bNT), dopada con flúor y fósforo y cargada de gentamicina y vancomicina(GV,) a la hora de prevenir la infección asociada a implantes provocada por *S. aureus* .

Se ha evaluado la carga y liberación de antibiótico(GV) mediante cromatografía líquida de alto rendimiento. Además, se ha descrito la citocompatibilidad y la eficacia de bNT Ti_6Al_4V contra la infección por *S. aureus* en un modelo in vivo en conejo. El antibiótico se liberó siguiendo un modelo no lineal de Boltzmann, y las máximas concentraciones se obtuvieron a los 240 minutos para ambos antibióticos. La proliferación celular de las células osteoblásticas MCT3T3-E1 aumentó de manera significativa las 48(28%) y 168 horas(68%), así como la matriz de mineralización de estas células (52%) y los genes de expresión de tres de los más importantes marcadores relacionados con la diferenciación ósea(más del triple para VEGF y BGLAP, y un 65% para Run-X) comparado con el grupo control.

Los resultados del estudio in vivo muestran que bNT Ti_6Al_4V puede prevenir la infección asociada a implantes causada por *S. aureus* según los resultados histopatológicos y microbiológicos. Según nuestros resultados, la aleación bNT Ti_6Al_4V cargada con una mezcla de gentamicina y vancomicina mediante el

método de inmersión ofrece un horizonte prometedor como biomaterial, con una favorable capacidad de osteointegración, gran citocompatibilidad , demostrando además propiedades bactericidas contra *S. aureus*.

ABSTRACT

Prosthetic joint infection (PJI) is one of the most devastating complications in orthopedic surgery. One approach used to prevent PJI is local antibiotic therapy. This study evaluates the antibiotic release, in vitro cytocompatibility and in vivo effectiveness in preventing PJI caused by *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) of the fluorine- and phosphorus-doped, bottle-shaped, nanostructured (bNT) Ti₆Al₄V alloy loaded with a mixture of gentamicin and vancomycin (GV). We evaluated bNT Ti₆Al₄V loading with a mixture of GV, measuring the release of these antibiotics using high-performance liquid chromatography. Further, we describe bNT Ti₆Al₄V GV cytocompatibility and its efficacy against *S. aureus* using an in vivo rabbit model. GV was released from bNT Ti₆Al₄V following a Boltzmann non-linear model and maximum release values were obtained at 240min for both antibiotics. The cell proliferation of MCT3T3-E1 osteoblastic cells significantly increased at 48 (28%) and 168 h (68%), as did the matrix mineralization (52%) of these cells and the gene expression of three of the most important markers related to bone differentiation (more than threefold for VEGF and BGLAP, and 65% for RunX) on bNT Ti₆Al₄V GV compared with control. In vivo study results show that bNT Ti₆Al₄V GV can prevent *S. aureus* PJI according to histopathological and microbiological results. According to our results, bNT Ti₆Al₄V loaded with a mixture of GV using the soaking method is a promising biomaterial with favorable cytocompatibility and osteointegration, demonstrating local bactericidal properties against *S. aureus*.

ÍNDICE

Lista de abreviaturas	7
1. Introducción	13
1.1 Factores de riesgo	16
1.1.3 Factores propios del paciente	16
1.1.2 Factores perioperatorios	18
1.1.1 Riesgo relacionado con la bacteriemia	19
1.2 Prevención	19
1.2.1 Medidas preoperatorias	19
1.2.2 Medidas perioperatorias	20
1.2.3 Medidas intraoperatorias	21
1.2.4 Medidas postoperatorias	23
1.3 Clínica	24
1.4 <i>Biofilm</i>	25
1.5 Microbiología	28
1.6 Diagnóstico	30
1.6.1 Pruebas de imagen	30
1.6.2 Test sanguíneos	31
1.6.3 Estudio del líquido articular	32
1.6.4 Tejido periprotésico	33
1.6.5 Diagnóstico molecular	35

	Índice
1.7 Tratamiento de la infección protésica	36
1.7.1 Principios generales	36
1.7.2 DAIR	36
1.7.3 Recambio en un tiempo	37
1.7.4 Recambio en dos tiempos	37
1.7.5 Artroplastia de resección	38
1.7.6 Artrodesis	39
1.7.7 Amputación	39
1.7.8 Tratamiento supresor	39
1.8 Tratamiento de la osteomielitis	40
1.9 Integración de los implantes	41
1.10 Nuevos materiales antiinfecciosos	45
1.10.1 Materiales antiadherentes	49
1.10.2 Materiales con propiedades antibacterianas	49
1.10.3 Materiales multifuncionales	52
1.10.4 PMMA y otras formas de administración antibiótica local	52
2.Hipótesis	57
3. Objetivos	61
4. Material y Métodos	65
4.1 Fabricación del Implante	67
4.2 Características generales del modelo animal	73

	Índice
4.3 Intervención quirúrgica	77
4.4 Control postoperatorio	78
4.5 Estudio histopatológico	81
4.6 Estudio microbiológico	83
4.7 Estudio estadístico	83
5. Resultados	87
5.1 Carga antibiótica y liberación desde los nanotubos	89
5.2 Estudio celular	91
5.3 Estudio histopatológico y microbiológico	93
6. Discusión	99
7. Conclusiones	107
8. Bibliografía	111

LISTA DE ABREVIATURAS

Relación de abreviaturas que aparecen en el texto. En muchos casos, se ha mantenido la correspondiente abreviatura en inglés debido a su frecuente utilización en el lenguaje científico.

AAOS American Academy of Orthopaedic Surgeons

ADVP Adictos a Drogas por Vía Parenteral

AP Anatomía patológica

Arg Arginina

Asp Aspartato

ASTM American Society for Testing Materials

BGLAP Bone carboxyglutamic acid-containing protein

BGN Bacilos Gram Negativo

BMP2 Bone Morphogenetic Protein 2

CDC Centers for Disease Control

CGA Campos de Gran Aumento

CFU/ML Unidades formadoras de colonias por mililitro

Cm Centímetro

Cm² Centímetro cuadrado

CMI Concentración Mínima Inhibitoria

CO₂ Dióxido de carbono

CP Chemical polish

CrCoMo Cromo Cobalto Molibdeno

CrNiMo Cromo Níquel Molibdeno

DAIR Debridement, antibiotics and implant retention

E Especificidad

EE.UU Estados Unidos

FDG-PET Tomografía por emisión de positrones con fluorodexosiglucosa

FEG SEM Field Emission Gun Scanning Electron Microscope

FGF2 Basic fibroblast growth factor

G/dl Gramos por decilitro

Gly Glicina

GV Gentamicina Vancomicina

H Horas

HF Fluoruro de hidrógeno

IAM Infarto Agudo de Miocardio

IFN α Interferón alfa

IgA Inmunoglobulina A

IgM Inmunoglobulina M

IIS-FJD Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Universitario Fundación

Jiménez Díaz

IL-6 interleukina 6

IL-B1 Interleukina b1

IMC Índice de Masa Corporal

INR International Normalized Ratio

IPA Infección protésica aguda

IPC Infección protésica crónica

Kg Kilogramo

Kg/m² Kilogramo por metro cuadrado

McF McFarland

Mg Milígramo

Mg/dl Miligramo por decilitro

Min Minuto

Mm Milímetro

mM milimolar

Mm/h Miliímetros por hora

NaCl Cloruro de sodio

Ng/ml Nanogramos por decilitro

NIH National Institutes of Health

Nm Nanómetro

OMS Organización Mundial de la Salud

OR Odds Ratio

PCR Proteína C reactiva

PCR Reacción en cadena de la polimerasa

PET Tomografía de emisión de positrones

Pg/ml Picogramos por decilitro

PJI Prosthetic Joint Infection

PMMA Polimetilmetacrilato

PMN Polimorfonucleares

PMN/CGA Polimorfonucleares por campos de gran aumento

PTC Prótesis total de cadera

PTR Prótesis total de rodilla

PVC Policloruro de Vinilo

RANK Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa

RANKL Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa Ligand

RM Resonancia magnética

RPM Revoluciones por minuto

RP-HPLC Cromatografía líquida de fase inversa de alto rendimiento

RT-PCR Reacción en cadena de polimerasa de transcripción inversa

S Sensibilidad

SAMS *Staphylococcus aureus sensible a meticilina*

SARM *Staphylococcus aureus resistente a meticilina*

SCN Estafilococos coagulase negativos

SDS Sodio dodecil sulfato

SEM Scanning Electron Microscope

SHEA Society for Healthcare Epidemiology of America

sICAM-1 Soluble intercellular adhesion molecule-1

SS Suero salino

TC Tomografía computerizada

TEM Transmission electron microscopy

TGF β 2 Factor de crecimiento transformante beta 2

Ti₆Al₄V Titanio Aluminio Vanadio

TiO₂ Dióxido de Titanio

TNF Factor de Necrosis Tumoral

TSB Caldo de Triptona de Soja

UFC Unidades formadoras de colonias

UFC/cm² Unidades formadoras de colonias por centímetro cuadrado

UFC/g Unidades formadoras de colonias por gramo

V Voltios

VEGF Factor de crecimiento endotelial vascular

VPN Valor predictivo negativo

VPP Valor predictivo positivo

VS Versus

VSG Velocidad de sedimentación eritrocitaria

µg/mL Microlitros por mililitro

µL Microlitros

α-MEM Minimum Essential Medium Eagle - Alpha Modification

1. INTRODUCCIÓN

*«Equipado con sus cinco sentidos, el hombre
explora el universo que lo rodea y a sus
aventuras las llama ciencia».*

Edwin Powell Hubble

En Reino Unido y EE.UU. se realizan unas 800.000 prótesis de cadera y rodilla al año, estimándose que este número puede superar los 4 millones en 2030, debido al creciente envejecimiento de la población.(1,2) La tasa de infección en este tipo de cirugías varía entre el 1% en las prótesis de cadera al 1-2% en las prótesis de rodilla(3); se calcula que este porcentaje se incrementará por la creciente presencia de comorbilidades, por lo que la importancia de esta patología aumentará en los próximos años de forma exponencial.(4) En un reciente análisis de datos de Medicare, considerando a los pacientes intervenidos entre 2005 y 2015, se concretó el riesgo de infección a cinco años en un 1.09% para prótesis de cadera y 1.38% para prótesis de rodilla; estas cifras no varían significativamente a los diez años de seguimiento.(4) Además, la infección periprotésica aumenta considerablemente la mortalidad, con un OR en el primer año de 3,05 tras infección protésica de rodilla y de 3,58 tras infección protésica de cadera, siendo la tasa de mortalidad a cinco años del 33% en cadera y 28% en rodilla.(5) La cirugía de revisión de una prótesis de cadera infectada supone un gasto 2,8 veces mayor que un recambio por un aflojamiento aséptico y 4,8 veces mayor que una prótesis primaria(1) sumando un coste total de entre 53.000 y 90-100.000 dólares, dependiendo de diferentes variables. El gasto total estimado en EE. UU debido a infección protésica alcanzó en 2009 los 566 millones de dólares, y se estima que en 2020 pueda alcanzar los 1,62 billones de dólares. Asimismo, las infecciones protésicas suponen el 26.5% de las demandas judiciales por negligencia médica en algunos estados de EE.UU.(6)

Dado el esperable aumento de enfermos a nivel global, la importancia económica de esta patología es claramente de relevancia creciente.

Por otro lado, en fracturas la tasa de infección varía desde el 1% en fracturas cerradas de baja energía hasta el 30% de las fracturas de tibia abiertas(7), con lo que la importancia de las infecciones asociadas a implantes ortopédicos en sentido amplio es incluso mayor, si consideramos además las infecciones asociadas a osteosíntesis.

Las infecciones pueden proceder por contaminación directa del sitio quirúrgico, diseminación hematógena o recurrencia de una infección pasada. Esta patogenia, no obstante, se complica con otro tipo de factores, que se expondrán a continuación.

1.1 FACTORES DE RIESGO(8,9)

Se han descrito una serie de factores de riesgo relacionadas con el desarrollo de una infección asociada a implantes.(8) Identificarlos puede ayudar a diseñar una estrategia para prevenir la infección, ya que la presencia de dos o más factores de riesgo aumenta de forma significativa el riesgo de desarrollar una infección protésica.(10)

En este sentido, los factores de riesgo se pueden dividir entre:

1.1.1 Factores propios del paciente

Obesidad

Definida como un peso superior en un 20% al IMC o peso ideal. Se ha relacionado con un mayor tiempo de cirugía, mayor necesidad de transfusiones o mayor número de comorbilidades; sin embargo, diversos estudios lo han mantenido como un factor independiente, llegando a describirse un aumento de un 10% en el riesgo de infección por cada kg/m² de exceso en el IMC. La

cirugía bariátrica parece disminuir la tasa de complicaciones e infección a corto plazo en cirugía de rodilla, pero no de cadera, siendo nulo su papel en la prevención de complicaciones a largo plazo.(11)

Diabetes

Es otro de los factores de riesgo descritos, con un aumento del riesgo de infección cuando la glucemia en la primera mañana tras la cirugía es superior a 200 mg/dl.

Artritis reumatoide

Los pacientes con artritis reumatoide presentan una probabilidad de entre dos y cuatro veces más que la población general de desarrollar una infección asociada a implantes, incrementándose cuando se trata de cirugías de revisión o de pacientes con antecedentes de infección en cirugías previas. También hay un aumento del riesgo cuando se trata de una enfermedad crónica, mal controlada o tratada con los denominados fármacos biológicos. Además, una dosis mayor de 10mg/día de prednisona aumenta el riesgo entre 4 y 7 veces. No se ha demostrado aumento del riesgo con el empleo de metotrexato, mientras que no existen datos suficientes en cuanto al uso de sulfasalazina, hidroxicloroquina, leflunomida ni azatioprina. Respecto a los fármacos anti-TNF alfa, se recomienda suspenderlos entre 15 y 30 días antes de la cirugía, en función de su vida media, y reintroducirlos tras el cierre de la herida quirúrgica(12), si bien su importancia como factor de riesgo específico en este tipo de infecciones tampoco ha sido demostrada.

Tabaquismo

Los fumadores tienen mayor probabilidad de desarrollar una infección protésica en cadera y rodilla según una revisión sistemática(13), estando probablemente relacionado el tabaquismo con la vasoconstricción adyacente a la herida.

Factores de riesgo hematológicos

Tanto los niveles bajos de hemoglobina como un INR mayor de 1,5 se han descrito como factores predisponentes para el desarrollo de la infección.

Otros

La colonización nasal persistente por *S. aureus* o la existencia de antecedentes de infección protésica (aunque sea por otro microorganismo) son también factores de riesgo descritos.

1.1.2 Factores perioperatorios

Se considera que la infección protésica se adquiere fundamentalmente en el quirófano. Entre los factores de riesgo perioperatorios descritos están las roturas de los guantes, el número de personas dentro del quirófano, la hipotermia y la administración incorrecta de la profilaxis antibiótica, así como una duración de la cirugía mayor de 120 minutos.

Otras potenciales complicaciones de la cirugía, tales como los hematomas, seromas, dehiscencias, etc. también se consideran factores de riesgo.

Entre los factores de riesgo independientes de la cirugía y de la herida están el IAM y la fibrilación auricular, la anemia de un grado que requiera transfusiones sanguíneas y una estancia media prolongada.

1.1.3 Riesgos relacionados con la bacteriemia

La probabilidad de una diseminación a distancia en el contexto de una infección concomitante es muy baja, en torno al 0.1%. Sin embargo, el porcentaje de infección protésica en el contexto de una bacteriemia por *S. aureus* alcanza el 35%. No obstante, en cuanto a los procedimientos dentales, los últimos estudios no han demostrado un aumento de las tasas de infección protésica ni la necesidad de una profilaxis específica.

1.2 PREVENCIÓN(14,15)

1.2.1 Medidas preoperatorias

Descolonización nasal de *S aureus*

Aproximadamente el 30% de las infecciones protésicas se deben a *S. aureus*, siendo la tasa de colonización nasal de alrededor del 25% en la población general, observándose además un aumento de la tasa de *S. aureus* meticilín-resistente. Un estudio reciente ha demostrado la disminución de la tasa de infecciones por *S. aureus* del 1.11% al 0.34% tras el tratamiento de los portadores nasales. En este sentido, la OMS recomienda el tratamiento con mupirocina al 2% para los portadores nasales de este microorganismo.

Lavado preparatorio

Su meta es la disminución de la carga bacteriana de la piel. Se recomienda hacerlo con jabón antiséptico o líquido antibacteriano, aunque probablemente el mejor método sea el uso de clorhexidina dada su actividad frente a

patógenos como el SARM. Se recomienda un lavado de todo el cuerpo al menos la noche anterior a la cirugía.

Terapias inmunosupresoras

Los pacientes con enfermedades reumatológicas en tratamiento con fármacos biológicos presentan un mayor riesgo de presentar una infección proteica tras la cirugía, aunque un reciente estudio no ha encontrado relación significativa entre el tratamiento con estos fármacos y la infección. El II Consenso Internacional recomienda la suspensión de los mismo en función de su vida media antes de la cirugía, mientras que la OMS afirma que no se deben de suspender de forma rutinaria, si no que ha de individualizarse cada caso (recomendación débil).

1.2.2 Medidas perioperatorias(2,3)

Control glucémico

Entre el 8 y el 22% de los pacientes que se someten a una artroplastia tienen diabetes, y hasta un tercio presentan una hiperglucemia no diagnosticada. Las recomendaciones de la CDC y la SHEA son de mantener la glucemia en ayunas por debajo de 200 mg/dl y la glucemia postoperatoria por debajo de 180 mg/dl.

Profilaxis antibiótica

La mayoría de las cefalosporinas de primera generación son activas frente a patógenos implicados en las infecciones asociadas a implantes. En pacientes colonizados por SARM o con alto riesgo de estarlo, tales como los pacientes institucionalizados o en diálisis, se puede utilizar vancomicina o teicoplanina.

Se recomienda que la profilaxis haya finalizado dentro la última hora previa a la cirugía; cuando la cirugía se prolonga o presenta gran pérdida de sangre se recomienda repetirla. Tanto el CDC como la OMS sugieren que no se requiere antibiótico tras el cierre de la herida. La cefazolina, en dosis de 1-2g cada 8 horas en función del peso del paciente, o la cefuroxima en dosis de 1,5 g, seguidas de 750 mg cada 8 horas, son dos de los antibióticos recomendados. En pacientes alérgicos a beta-lactámicos o colonizados por SARM se aconseja vancomicina cada 12 horas a dosis de 15 mg por kilo.

1.2.3 Medidas intraoperatorias

Circulación en quirófano

Se debe reducir el número de personas dentro del quirófano al mínimo imprescindible, así como el número de entradas y salidas de este.

Flujo laminar

Los sistemas de flujo laminar han demostrado la disminución de carga bacteriana en el ambiente, aunque hay estudios que dudan de su coste-efectividad, haciendo su uso cuestionable.

Trajes especiales en quirófano

Existen estudios contradictorios respecto al uso de trajes herméticos estériles de alta eficiencia, por lo que éste no se recomienda. En un reciente estudio, se asocia el uso de estos trajes a un aumento en la presencia de partículas y microorganismos respecto a la indumentaria habitual, poniendo en duda la idoneidad de su uso rutinario(16)

Preparación del sitio quirúrgico

Se debe realizar con una solución alcohólica, considerando realizar un doble pintado por el riesgo de contaminación durante la colocación del campo quirúrgico.

Normotermia y oxigenación

Asegurar la normotermia y oxigenación manteniendo el adecuado riego sanguíneo de la zona quirúrgica puede reducir el riesgo de infección, ya que garantiza un mejor desempeño del sistema inmune. Se pueden utilizar fluidos precalentados o dispositivos de calor pre o intraoperatorios.

Cemento con antibiótico

En ausencia de evidencia contrastada, el II Consenso Internacional recomienda el uso de cemento con antibiótico en pacientes de alto riesgo en cirugía ortopédica. Sin embargo, en un meta-análisis publicado en 2018, el uso de cemento con antibiótico no redujo el riesgo de infección protésica, aumentando el coste entre 155,000- 310,000 dólares al año en centros donde se intervengan al menos 1000 prótesis de rodilla al año.(17)

Además, se han descrito complicaciones como el síndrome del hombre rojo(18) y la dermatosis bullosa por IgA(19) secundarias al uso del cemento con vancomicina.

Lavado de la herida

Hay consenso general en cuanto al lavado intraoperatorio de la herida, aunque la eficacia y el tipo de lavado no es concluyente. El uso de povidona yodada parece seguro y eficiente para el lavado de la herida, si bien se pueden usar otros antisépticos como la clorhexidina. Un estudio ha comparado diversas

soluciones, tales como la clorhexidina, la povidona yodada, el agua oxigenada, el dióxido de cloro y el hipoclorito de sodio frente a *S. aureus* sobre materiales ortopédicos. Las más eficaces fueron la povidona yodada y el agua oxigenada, con reducciones de las UFC del orden del 98 y 97% respectivamente(20). En cuanto a los apósitos, no se recomienda el uso rutinario de apósitos que incluyan antibiótico

1.2.4 Medidas postoperatorias

Transfusiones

Un reciente meta-análisis(15) demostró que la prevalencia de infección protésica era mayor en pacientes que recibieron una transfusión sanguínea (2,88% frente a 1,74%). En este sentido, se deben optimizar los niveles de hemoglobina preoperatorios, utilizando eritropoyetina si fuera necesario.

Medidas intraoperatorias como el uso de isquemia, una correcta hemostasia o el ácido tranhexámico intravenoso ayudan a reducir la necesidad de transfusión.

Complicaciones de herida

La formación de hematoma y el drenaje de material por la herida quirúrgica se consideran factores de riesgo para desarrollar una infección protésica. El uso de apósitos compresivos, dispositivos de presión negativa o la evacuación de la herida pueden ayudar en el manejo de la herida, aunque la mejor estrategia consiste en la prevención mediante una buena hemostasia y un adecuado cierre de esta.

Procedimientos dentales(2)

Pocos estudios han demostrado la existencia de alguna relación entre los procedimientos dentales y la infección protésica. Pese a ello la AAOS sigue recomendando la profilaxis antibiótica en pacientes que se van a someter a procedimientos dentales invasivos, sin especificar la duración de esta.

1.3 CLÍNICA(21)

La clínica de presentación de una infección protésica articular depende de varios factores: la virulencia del patógeno, el tiempo de evolución desde la cirugía índice, la respuesta del paciente, la articulación involucrada y el estado de los tejidos blandos circundantes.

Dentro de los síntomas y signos descritos se encuentran el dolor, la inflamación, el eritema y el aumento de temperatura. Dependiendo de las series la presencia de dolor varía entre el 42% hasta el 100%.(22) Si el patógeno es de alta virulencia puede causar episodios febriles, aunque no suele ser lo más frecuente y suele estar restringido a los cuadros agudos. Los tejidos blandos se pueden ver afectados de forma difusa como celulitis, o bien localizada en forma de trayectos fistulosos. Si se trata de una infección crónica, además de un dolor persistente se puede objetivar aflojamiento protésico en las pruebas de imagen

1.4 BIOFILM (23–25)

El principal mecanismo patogénico de la infección asociada a implantes es la producción del *biofilm* bacteriano. El *biofilm* está presente entre un 65%(CDC) hasta el 80%(NIH) de los casos de infección humana(26), lo que da una idea de su importancia en este tipo de patología, especialmente en infecciones crónicas.

Los *biofilm* se definen como comunidades multidimensionales en las que las bacterias coexisten dentro de una matriz celular que ellas mismas fabrican. Aunque en fases iniciales todos presentan unos mecanismos comunes, cada especie forma una comunidad multicelular única. De esta manera son capaces de protegerse frente a la respuesta inmune del huésped, así como frente a la acción de los antibióticos. Los *biofilms* son capaces de generarse tanto sobre superficies vivas como inertes(27), y se caracterizan por la formación de una matriz extracelular polimérica por parte de los microorganismos al mismo tiempo que se multiplican sobre la superficie del implante. Una vez desarrollado, el *biofilm* conduce a una infección persistente, resistente a antibióticos y con gran tolerancia a la respuesta inmune del paciente.

En el *biofilm*, además, los microorganismos establecen relaciones entre ellos que dan lugar a la diferenciación de diversas subpoblaciones microbianas. Estas subpoblaciones adoptan diferentes estados metabólicos variando su expresión genética, y haciéndolos difíciles de detectar mediante los procedimientos convencionales de cultivo. Esto supone un reto a la hora de realizar el diagnóstico, ya que las técnicas habituales están pensadas para detectar bacterias en estado planctónico y no sésil.

Un aspecto controvertido es el tiempo necesario para formar un *biofilm* maduro en el paciente. Parece claro que a las tres semanas de evolución se ha formado el *biofilm* bacteriano, aunque hay autores que defienden que se puede formar en horas o pocos días.(28)

Entre los materiales más comunes sobre los que se forma el *biofilm* se encuentran el PVC, la silicona, el poliestireno o los metales. Cuando el *biofilm* toma directamente sus nutrientes directamente de la superficie a la que se adhiere, se hace muy dependiente de ese sustrato; así la comunidad bacteriana crecerá desde el centro de la colonia en función de los gradientes del entorno. De esta manera, las células de la periferia protegen a las del interior, a la vez que acaparan un mayor número de nutrientes. Para alcanzar un equilibrio metabólico que no mate las bacterias del interior por falta de nutrientes, el *biofilm* desarrolla una organizada actividad metabólica por la que las células de la periferia detienen su crecimiento periódicamente, evitando la muerte de las del centro. De esta manera, la codependencia metabólica ofrece una solución elegante al conflicto entre protección y lucha por los nutrientes.(29) El ciclo del *biofilm* acaba cuando las bacterias se dispersan desde la masa una vez alcanzada la maduración. Puede ser de manera pasiva, por estrés por cizallamiento, o de manera activa, debido a fluctuaciones en la disponibilidad de nutrientes u oxígeno, estrés metabólico o presencia de productos tóxicos.(30)

Además de los distintos modelos *in vitro*, se han desarrollado modelos *in vivo* para el estudio del *biofilm*, pues de esta manera se puede lograr un entorno más controlado y realista. Uno de ellos utiliza piel de cerdo, permitiendo valorar la acción frente al *biofilm* de agentes antisépticos derivados de la clorina así como de los antibióticos.(31) En cuanto a infección protésica, se ha realizado otro

modelo *in vivo* en sangre con inoculación de una cepa de *S. epidermidis* procedente de una infección protésica, pudiendo determinar el papel de las adhesinas intercelulares y el factor del complemento C5a en las infecciones protésicas.(32) Los modelos *in vivo* también se pueden usar para estudiar las hipotéticas ventanas de diversas pautas de tratamiento; por ejemplo, se ha demostrado una mayor susceptibilidad en el tratamiento del *biofilm* de *S. aureus* sobre piel de cerdo en las primeras 24 horas, progresando al alcanzar las 48 horas de evolución, y adquiriendo su resistencia original a las 72 horas.(33)

El proceso de formación del *biofilm* comienza siempre con la fase de adherencia bacteriana a la superficie. En el caso de la infección asociada a implantes se considera que este proceso tiene lugar en la denominada “carrera hacia la superficie”(34), en la que se establecería una competición entre las células del paciente y los microorganismos para ver cual de ellos coloniza primero el implante. En el caso de que los microorganismos colonizasen primero la superficie, se desarrollaría el *biofilm*, y, por ello, aparecería una infección.

Existen diversos modelos que han intentado imitar *in vitro* esta teoría para evaluar además el efecto de las modificaciones del material con vistas a prevenir la infección. Uno de los modelos ha permitido determinar que las diferentes cepas bacterianas poseen propiedades patogénicas diferentes entre ellas, y no solo entre especies(35), mientras que otro de ellos ha demostrado que cuando las células eucariotas recubren el material es mucho más difícil para las bacterias poder colonizarlo.(36)

En otro estudio se ha intentado diferenciar la capacidad de formar *biofilm* sobre osteoblastos entre *S. epidermidis* procedente de un portador nasal y otras cepas

aisladas en infecciones asociadas a implantes (prótesis de cadera y rodilla e infección de osteosíntesis), sin encontrarse diferencias. Todos estos estudios apoyan la teoría de que la infección por esta bacteria se produce de forma accidental al colonizar los implantes o el sitio quirúrgico.(37)

Respecto a la capacidad de eliminación de *biofilm*, un estudio demostró que la combinación de polvo de glicina y fosfato tricálcico era significativamente superior a la glicina y al bicarbonato de sodio a la hora de eliminar el *biofilm* de una superficie de óxido de titanio.(38)

1.5 MICROBIOLOGÍA(8)

La epidemiología varía entre EE. UU, donde los patógenos más frecuentes son *S. aureus* (SARM y SAMS) y *S. epidermidis*, tanto sensibles como resistentes a oxacilina. En cambio, en Europa el microorganismo más prevalente son los SCN, seguido de *S. aureus*, *Streptococcus sp.* y *Enterococcus sp.*

En todo caso, los cocos gran positivos engloban el 60-78% de las infecciones protésicas, de las cuales el 50-65% son causadas por *Staphylococcus sp.*.

S. aureus es un patógeno virulento, causante habitual de infecciones agudas y hematógenas. Los pacientes susceptibles de padecer una infección causada por *S. aureus* son los ADVP, diabéticos, pacientes con antecedentes de artritis reumatoide y portadores nasales de *S. aureus*.

Los SCN, entre los que predomina *S. epidermidis*, forman parte de la microbiota de la piel y son los responsables más importantes de las infecciones crónicas. Destacan por su capacidad de formar *biofilm*.

Enterococos y estreptococos suponen el 10%. *S. agalactiae* es el más frecuente de los estreptococos, mientras que más de la mitad de las infecciones por enterococos se producen en los primeros tres meses tras la cirugía, siendo más del 85% causadas por *E. faecalis*.

En cuanto a los bacilos gran negativos, se ha descrito una incidencia que varía entre el 17 y el 42%, dependiendo de la localización del estudio. Las infecciones por enterobacterias son una entidad al alza dentro de las infecciones protésicas, siendo los patógenos más frecuentes, en orden descendente, *E. coli*, *Proteus spp*, *Enterobacter spp* y *Klebsiella spp*.

Los patógenos anaerobios alcanzan el 7%(siendo claramente predominante *Cutibacterium acnes*), mientras que los bacilos gran positivos representan el 2% (sobre todo *Corynebacterium sp.*), en tanto que los hongos y las micobacterias representan un 1% aproximadamente.

Por último, las infecciones con cultivo negativo varían entre el 6 y el 34% dependiendo de las series(39,40).

La mayoría de las infecciones son monomicrobianas (80%), y dentro de los causantes de infecciones polimicrobianas destacan BGN, enterococos y *S. aureus*. Suponen el 35% de las IPA y menos del 20% de las IPC.

Las infecciones agudas suelen ser causadas por microorganismos virulentos, tales como *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, y enterobacterias, mientras que las crónicas suelen estar causadas mayoritariamente por *S. epidermidis* y las hematógenas por *S. aureus*. En los últimos años destaca un creciente número de infecciones causadas por microorganismos multirresistentes.(41)

1.6 DIAGNÓSTICO(25)

1.6.1 Pruebas de imagen(42)

Radiografía simple

Presenta baja especificidad y sensibilidad. Permite observar líneas de radiolucencia y osteólisis.

Tomografía Computarizada(TC)

Es útil para visualizar la inflamación articular, abscesos y trayectos fistulosos; aunque el metal de los implantes puede artefactar las imágenes.

Resonancia Magnética(RM)

Tiene mayor resolución para las partes blandas, aunque no se puede usar con todos los tipos de implantes

Tomografía por Emisión de Positrones(PET)

El FDG-PET permite visualizar la captación de las células inflamatorias con aumento de actividad metabólica (leucocitos, macrófagos) pudiéndose valorar como resultado positivo la captación en tejidos blandos periprotésicos o en la interfaz hueso-implante. Presenta una sensibilidad del 82% y una especificidad del 87%.

La técnica de elección en cuanto a medicina nuclear para el diagnóstico de la infección proteica en el PET con leucocitos marcados, con similar especificidad y menor sensibilidad que el FDG-PET en cadera y similar sensibilidad y mayor especificidad en rodilla.

1.6.2 Test sanguíneos

Recuento leucocitario

Presenta una baja sensibilidad (45%), por lo que no se considera un marcador muy valorable.

Proteína C reactiva(PCR) y velocidad de sedimentación sanguínea (VSG)

Son baratas, poco complejas y están disponibles. Las cifras a partir de las que se consideran patológicas son 30mm/h y 1g/dl respectivamente.

Tiene una sensibilidad del 75 y 88% respectivamente, con una especificidad del 70 y 74%. De manera combinada, la sensibilidad alcanza el 96%; con lo que resultados negativos en ambas pruebas indican que la probabilidad de que exista infección es baja.

Su mayor limitación es la baja especificidad, ya que ambas se pueden alterar por otras patologías, tales como tumores o enfermedades autoinmunes.

Otras pruebas de laboratorio

La interleukina 6(IL-6) ha sido propuesta para el diagnóstico de la infección protésica, con un valor patológico si es mayor de 8-9 pg/ml; la sensibilidad y especificidad varían entre 40-80 % 81-77 %. En cuanto a la procalcitonina, con un valor de corte mayor de 0.3 ng/mL la S 98% E 33%: Otros marcadores propuestos son el IFN α , IgM o sICAM-1.

1.6.3 Estudio de líquido articular (21,43)

Ante la sospecha de infección protésica se puede considerar la opción de realizar una artrocentesis para estudio de líquido articular. Se puede obtener por artrocentesis directa o bien guiado por técnicas de imagen, ya sea ecografía o radiografía. Uno de los parámetros más empleados es el estudio de la celularidad. El umbral que se recomienda, basado en el mayor estudio realizado hasta la fecha es de 1100 neutrófilos por microlitro, con un 64% de neutrófilos en PTR, otorgando un VPN de la combinación de las dos pruebas del 98.2%, confirmándose la infección en un 98.6% de los casos. En cuanto a las infecciones de PTC, parece que los umbrales serían más altos que para las PTR; lo que en parte se puede deber a la mayor aparición del *S. aureus* como patógeno responsable. Reseñar que tanto la inflamación postoperatoria, los recambios por el fracaso del par metal-metal como el hemartros pueden alterar el recuento leucocitario del líquido articular.(21,44)

Esterasa leucocitaria(45)

Se trata de una enzima producida por los neutrófilos, que se puede detectar mediante el uso de una tira reactiva de las empleadas en orina. Un resultado positivo (++) presenta una sensibilidad del 80.6%, con una especificidad del 100%, siendo el VPP del 100% y el VPN del 93.3%. Uno de los problemas que presenta es que la presencia de sangre en la muestra invalida el resultado.

Alfa defensina(46)

Es un péptido antimicrobiano segregado de forma natural por los neutrófilos, que se integra y destruye la membrana de las bacterias. Es una prueba sencilla, pero de elevado coste (760 dólares por unidad). Un metaanálisis de 6

estudios sobre la infección protésica articular demostró una sensibilidad del 100% con una especificidad del 96%.

Otros marcadores sinoviales

En cuanto a otras determinaciones del líquido sinovial propuestas para el estudio de la infección protésica se encuentran la Proteína C reactiva, la IL-B1, la procalcitonina o la IL-6. Esta última ha demostrado una sensibilidad del 87% y una especificidad del 90% en infección protésica de hombro.(47)

1.6.4 Tejido periprotésico

Tinción de GRAM

Se trata de una manera rápida de identificar la presencia de bacterias en el tejido perimplante. Sin embargo, dada su baja sensibilidad (0-27%) y la existencia de otras pruebas más fiables, no se recomienda su uso de rutina, aunque su alta especificidad podría ser de utilidad en algunas formas con elevada carga bacteriana (infecciones agudas, sobre todo).

Cultivo

Se trata de una herramienta básica a la hora de diagnosticar infecciones asociadas a implantes. La presencia de dos o más cultivos positivos constituye un criterio mayor y supone el diagnóstico de infección.(48) Aunque según algunos estudios deben mantenerse hasta 14 días después de su incubación, para permitir la detección de patógenos tales como *C. acnes* presentan un crecimiento lento.(49) De acuerdo con el protocolo de referencia de Atkins, se deben recoger al menos 3-5 muestras de tejido periprotésico para el estudio, con una S del 65% y una E del 99. 6%(50), considerando como causa de la

infección a aquellos microorganismos poco patógenos que aparecen al menos en 2 muestras, o a aquellos organismos muy patógenos que se detecten independientemente del número de muestras positivas. A pesar de que la presencia de fístulas constituye otro criterio mayor, y como tal, definitorio de infección; no se recomienda la recogida de torundas de estas debido a su baja sensibilidad y especificidad, dada la no existencia de correlación de los cultivos del exudado con los cultivos de tejido obtenidos mediante cirugía.

Anatomía Patológica

La presencia de infiltrado inflamatorio en el estudio AP de las muestras obtenidas en el quirófano pueden ser sugerentes de infección del implante. Se trata de una técnica rápida, que no se ve alterada por la administración previa de antibiótico, pero que es dependiente del patólogo. Además, patógenos como los SCN y *C. acnes* pueden no causar una respuesta inflamatoria suficiente. La presencia de 5-10 neutrófilos en un campo de 400 aumentos tiene una S de 50-93% y una E de 77-100% a la hora de diagnosticar una infección asociada a implantes.(43)

Sonicación(23)

El uso de ultrasonidos para retirar el *biofilm* de los implantes es una herramienta útil a la hora de maximizar el rendimiento de cara al diagnóstico etiológico de la infección. La mayoría de los protocolos utilizan un tiempo de sonicación de entre 1 y 5 minutos (ya que el uso de tiempos más prolongados puede causar la muerte bacteriana) junto con un análisis cuantitativo del crecimiento bacteriano. La sonicación aumenta la sensibilidad de los cultivos, especialmente entre pacientes que han recibido tratamiento antibiótico previo y

en infecciones crónicas, llegando al 78.5-94.1% vs 60.8-88.2% de los cultivos tradicionales. En el momento actual no todas las guías clínicas recomiendan su uso; aunque según Esteban et al. Se debería utilizar siempre que sea posible ya que puede incrementar la capacidad diagnóstica de microbiología.(51)

1.6.5 Diagnóstico Molecular(52,53)

En los últimos años se han desarrollado técnicas de detección de material genético bacteriano en las muestras obtenidas, ya sea analizando los tejidos o el material obtenido por sonicación, mediante técnicas de PCR. Generalmente se considera que presenta una mayor sensibilidad frente al cultivo del material de sonicación, tanto en pacientes que no han recibido antibiótico previo como en los que sí. Un reciente metaanálisis determina que la sensibilidad es alrededor de un 60-70 %, con una especificidad por lo general superior al 95 %. Además demuestra que si el estudio molecular se realiza en pacientes con alta sospecha diagnóstica, la efectividad del mismo se incrementa exponencialmente.(54) En cuanto a las muestras que se pueden analizar, parece que el fluido de la sonicación presenta mayor precisión diagnóstica que el líquido articular.(55)

Otro de los métodos de diagnóstico molecular desarrollados recientemente es el llamado Metagenomic Shotgun, basado en la secuenciación y ordenación de todo el material genético presente en la muestra, que permite detectar microorganismos en infecciones con cultivos negativos y en recambios presuntamente asépticos.(56) Sin embargo, su utilidad práctica todavía está por ser definida claramente.

1.7 TRATAMIENTO DE LA INFECCIÓN PROTÉSICA

1.7.1 Principios generales

Para un resultado satisfactorio en el manejo de las infecciones protésicas se debe combinar el tratamiento quirúrgico con una adecuada terapia antibiótica. Según Díaz-Ledezma et al.(57), se considera como un tratamiento satisfactorio aquel que no requiere una nueva intervención derivada de la infección índice, con una curación clínica y microbiológica y libre de mortalidad asociada a la infección protésica. En cuanto al tiempo de evolución, se considera corto plazo cuando han transcurrido dos o menos años, medio plazo entre 5 y 10 años y largo plazo cuando el tiempo de evolución es mayor de 10 años.

1.7.2 Desbridamiento, antibioterapia y retención de implantes(DAIR)

Consiste en el recambio de los componentes móviles del implante junto con el desbridamiento del tejido periprotésico. Estaría indicado en infecciones agudas o hematógenas de menos de 1-3 meses de evolución (dependiendo de los autores), seguido de un tiempo de tratamiento antibiótico variable, habitualmente entre 3 y 6 meses. Entre las ventajas teóricas que presenta sobre los recambios protésicos están un menor coste económico, mayor conservación ósea, menor número de operaciones y mayor funcionalidad durante el proceso. El éxito aumenta cuando el procedimiento se realiza en las dos primeras semanas postoperatorias(82%), comparado cuando se realiza más allá de esas dos semanas(50%).(58) En cuanto a sus resultados, una revisión sistemática de la literatura demostró un éxito de sólo el 45.9% tras una DAIR, que aumentaba al 52% cuando se repetía el procedimiento.(59) En la

misma línea, un estudio multicéntrico obtuvo una tasa de fracaso del 57% tras DAIR e prótesis de rodilla.(60)

1.7.3 Recambio en un tiempo

Consiste en la retirada del implante, el lavado y reimplante en un solo acto quirúrgico. Posteriormente se administra antibioterapia entre 10 y 14 días. Estaría indicado en infecciones crónicas y agudas cronificadas. Es un procedimiento que se practica hasta en el 85% de los centros especializados en Europa y está ganando popularidad en Estados Unidos.

Entre los requisitos clásicos postulados a la hora de llevarlo a cabo están el diagnóstico de un germen sensible con buen estado de partes blandas, siendo las contraindicaciones infecciones por gérmenes multirresistentes o infecciones polimicrobianas, cultivos negativos, sepsis, mal estado de partes blandas o fracasos previos de recambio en un tiempo. Requiere un gran desbridamiento de partes blandas antes de reimplantar. Se recomienda añadir antibiótico activo frente al patógeno causante de la infección sin superar el 10% del peso total del cemento. Presenta una tasa de éxito de hasta el 93% a 10 años.(61)

1.7.4 Recambio en Dos Tiempos

Consiste en la retirada del implante en un primer tiempo, con toma de muestras, desbordamiento y colocación de un espaciador de cemento con antibiótico. Se administra antibiótico sistémico en un periodo entre 4 y 6 semanas (las dos primeras por vía intravenosa), seriando analíticas, y cuando se considera la infección controlada, tras un periodo de tiempo variable

(habitualmente dos semanas) sin administrar antibióticos, se realiza el implante de la nueva prótesis. El periodo de tiempo adecuado para la reimplantación no está definido, variando entre 6 y 8 semanas. Si se sospecha persistencia de la infección, se debe realizar nuevo desbridamiento y recambio del espaciador.

Algunos estudios describen factores que pueden ayudar a predecir qué pacientes presentan riesgo de fracaso; la presencia en líquido sinovial de más de 60.000 leucocitos, más de un 92% de neutrófilos o una VSG mayor de 99 mm/h se asocia aun aumento de la probabilidad del fracaso de entre 1.8 y 2.5 veces.(62)

Se pueden utilizar espaciadores de cemento con antibiótico preconformados, con una tasa de curación del 88%.(63)

Tras el segundo tiempo, no precisa de tratamiento antibiótico. Presenta tasas de éxito de entre el 79 y el 83%.(61)

1.7.5 Artroplastia de Resección(64,65)

Se trata de una técnica reservada a pacientes con infección proteica crónica no candidatos a reimplante, tales como pacientes de avanzada edad con numerosas comorbilidades, microorganismos multirresistentes no tratables, numerosos fracasos previos de recambios, ya sea en uno o dos tiempos o cuando técnicamente no se viable el recambio. Presenta una tasa de éxito entre el 59 y el 89% en relación con la curación de la infección, si bien el pronóstico funcional es peor que en las otras alternativas.

1.7.6 Artrodesis(66)

Técnica indicada en casos de infección crónica en pacientes no candidatos a reimplante, tales como pacientes jóvenes y activos con pérdida del mecanismo extensor de la rodilla, gérmenes multirresistentes no controlados o cuando hay una pérdida de remanente óseo. En rodilla se puede realizar mediante un enclavado endomedular o mediante un fijador externo, siendo con el enclavado mayor tanto la tasa de consolidación (95% frente a 67%) como la de recurrencia de la infección (8.3% frente a 4.9%). La tasa de complicaciones puede llegar al 40%. Se trata de una técnica óptima tras el fracaso de un recambio en dos tiempos frente a nueva revisión en dos tiempos, supresión crónica y amputación.

1.7.7 Amputación(67)

Se trata de una técnica con una indicación muy baja, en torno al 0.1%, ya que es la última opción de tratamiento en el manejo de la infección asociada a implantes. Está indicada cuando existe una sepsis amenazante, se ha perdido gran remanente óseo con mal estado de partes blandas o han fracasado otras técnicas en el control de la infección. El resultado es discreto, ya que solamente el 30% de los pacientes caminan y el 52% se desplaza en silla de ruedas.

1.7.8 Tratamiento Supresor(68–70)

El tratamiento antibiótico supresor tiene como meta el control de la sintomatología más que la curación de la infección. Está indicado en pacientes no candidatos a recambios, con un germen identificado y sensible a antibióticos orales que puedan administrarse de forma virtualmente indefinida. Por lo

general se considera que sólo ha de realizarse una vez llevada a cabo un DAIR. El antibiótico se administra por vía oral por un tiempo indefinido, y han de controlarse sus efectos adversos a largo plazo, existiendo contraindicación si existen otros implantes o válvulas cardíacas. La tasa de éxito varía entre el 18-24% y el 86% según las series. Aumentan el éxito un implante bien fijado, un microorganismo escasamente virulento y la disponibilidad de tratamiento antibiótico por vía oral.

1.8 **TRATAMIENTO DE LA OSTEOMIELITIS**

En cuanto al tratamiento de la osteomielitis, incluye varias modalidades, como el lavado y desbridamiento, la exéresis del tejido necrótico, el uso de colgajos e injertos para cobertura de espacios muertos o el tratamiento antibiótico sistémico, el cual requiere elevadas concentraciones de antibiótico en el lugar de la infección, sin llegar a provocar efectos secundarios y durante un largo periodo de tiempo. Se ha visto que *S. aureus* puede llegar incluso a internalizarse dentro de osteoblastos, osteocitos, en embriones de pollo(71,72) y en otras células humanas(73), tal y como parece suceder también en la infección protésica.

Como posible vector de administración local de antibiótico, Rutledge et al(74) han propuesto el uso de la policaprolactona, un poliéster alifático biodegradable, de la misma familia que el ácido poliglicólico, que presenta un mayor tiempo de degradación comparado con otros biomateriales.

Se comparó su acción, en un estudio in vivo en conejo, para tratar la osteomielitis inducida por una cepa de *S. aureus*, frente a un grupo control con

el inóculo y otro grupo que utilizó PMMA. Ambos implantes incluían tobramicina al 6%. A las 4 semanas de estudio, tras el sacrificio de los animales, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los implantes cargados de antibiótico y el grupo control, sin encontrarse evidencia de toxicidad.

Diefenbeck et al.(75) emplearon una superficie de óxido titanio macroporoso en el que se había obtenido un aumento de la osteointegración y fijación(76) junto con un recubrimiento de gentamicina fijado con ácido tánico o con sodio dodecilsulfato (SDS), en un experimento en ratas con una cepa de *S. aureus* , hallando una prevención e la colonización del implante del 90-100% y una reducción estadísticamente significativa en los estudios histológicos de osteomielitis en los grupos de material tratados con gentamicina.

1.9 INTEGRACIÓN DE LOS IMPLANTES

Entre los requisitos necesarios para la fabricación de un implante con propiedades antibacterianas están(77)

- Biocompatibilidad con el metabolismo del organismo huésped
- Evidencia, tanto in vivo como in vitro, de actividad antibacteriana
- No debe comprometer la osteointegración y fijación del implante
- Duración, de al menos dos años, del efecto antibacteriano
- Resistencia mecánica, tanto intra como postoperatoriamente

Se entiende como osteointegración el anclaje estable de un implante, conseguido mediante contacto directo entre hueso e implante. También se define, de una manera más biomecánica, como un proceso en el cual un material consigue una fijación rígida clínicamente asintomática con el hueso, mantenida durante la carga funcional.(78)

Los implantes se pueden integrar de diferentes formas.(79) Por un lado, se pueden unir al hueso simplemente de forma mecánica, como el empleo de un tornillo en un agujero brocado o una prótesis impactada previa al uso de las fresas correspondientes. Entre el implante y el hueso se forma una fina capa de colágeno, dependiendo la transmisión de fuerzas de la interconexión entre las superficies rugosas del implante y el hueso. Una opción para rellenar los huecos restantes es el uso de cemento PMMA, o la utilización de materiales osteoconductores, que provocan el crecimiento de hueso sobre ellos, dotando al implante de una fijación más ajustada. Así, metales como el titanio o algunas de sus aleaciones, que tiene esta capacidad, se pueden integrar en el hueso sin intervención de la capa de colágeno. Otros materiales presentan propiedades osteoinductoras, capaces de transformar las células mesenquimales en osteoblastos.

La forma del implante se tiene que adaptar al lugar de colocación, siendo más exigente ese ajuste cuando el implante no utiliza cemento. La ductilidad es otra de las propiedades que requieren implantes como las placas, para poder adaptarse a la forma del hueso.

La superficie del implante puede ser de varios tipos: pulida, que carecerá de poder osteoconductor y osteointegrador, mientras que la superficie granulada

fina del titanio lo dota de tal fijación que muchas veces el propio hueso es arrancado cuando se extrae el implante.

Para mejorar la integración del implante, a la vez que dotarle de una actividad biológica contra la infección, se han desarrollado diversos recubrimientos basándose en las propiedades del material.(80)

La rugosidad de la superficie del material puede tener efecto sobre la integración y diferenciación de los osteoblastos a través de diversos mediadores como la integrina $\alpha 2\beta 1$.(81) Además, estas superficies rugosas también pueden inhibir la acción de los osteoclastos modificando la actividad del ligando del factor activador nuclear kappa-B(RANKL), que se une a la osteoprotegerina en los osteoblastos; de esta manera impide que se una al receptor RANK y active así a los osteoclastos.(82)

En cuanto a la nanoestructura del titanio, se ha intentado recrear el entorno fisiológico del hueso en crecimiento. La nanoarquitectura se define por un tamaño del grano menor de 100 nm; así las superficies con grano menor de este tamaño han demostrado ser más efectivo en cuanto a la adhesión y proliferación de los osteoblastos comparado con las superficies con grano mayor de 100 nm.(83) Este aumento de la adhesión está en estrecha relación con un aumento de la adsorción proteica en la nanosuperficie. Al unirse a la superficie del material la vitronectina, se produce un cambio conformacional que aumenta el número de puntos de anclaje para los osteoblastos.(84)

En cuanto a la porosidad, tienen un efecto directo sobre la osteointegración, ya que permite el crecimiento de células osteogénicas en el implante. Poros

mayores de 1 mm provocan que el tejido que se forme sea de estirpe fibrosa en lugar de ósea, debilitando la unión entre hueso e implante.(85)

Los osteoblastos crecen en superficies de alta energía, que son aquellas de carácter hidrofílico, donde aumenta su adhesión celular, proliferación y modificación de factores mediadores; además secretan factores osteogénicos. Estas superficies también han demostrado mejorar la diferenciación de células mesenquimales hacia la estirpe ósea y el depósito de hueso mineral.(86)

Existen diversas propuestas para mejorar la osteointegración mejorando la composición de la superficie. Una de ellas es el uso de biocerámicas de fosfato cálcico, ya sea en forma de hidroxiapatita, que ha demostrado osteoconductividad tanto in vitro como in vivo, o fosfatos bifásico o tricálcico.(87)

También se han desarrollado componentes de la matriz extracelular, como el colágeno tipo I, sin embargo, existen ciertas desventajas, como el riesgo de infección o la variabilidad en la calidad. Para solucionarlo se ha propuesto el uso de un péptido Arg-Gly-Asp, que imitan ciertas secuencias de las moléculas de la matriz extracelular, aumentando la adhesión celular(88)

Por último, se han utilizado factores de crecimiento, como FGF-2, TGF- β 2 o BMP2, para mejorar la osteoconductividad de los implantes.

1.10 NUEVOS MATERIALES ANTIINFECCIOSOS(77)

El número creciente de cirugías ortopédicas hace pensar que inevitablemente el número de infecciones aumentará a la par. Actualmente se estima la incidencia de las infecciones de prótesis de cadera y rodilla en un 2.5%, en tanto que en cirugía de revisión puede llegar al 20%.(89) En los últimos tiempos el desarrollo de nuevos biomateriales se ha focalizado en el desarrollo de superficies con actividad antibacteriana que prevengan la adhesión, colonización y proliferación bacteriana que acabe por desarrollar el tan temido *biofilm*. La bacteria posee la habilidad para adherirse y sobrevivir en casi cualquier superficie mediante diversas adhesinas.

Uno de los materiales que tradicionalmente se ha utilizado para fabricar implantes en traumatología y cirugía ortopédica es el titanio, habitualmente en su aleación de Titanio-Aluminio-Vanadio (Ti_6Al_4V). Esto es debido a sus propiedades mecánicas y su biocompatibilidad. En comparación con el Cromo-Cobalto-Molibdeno (CrCoMo) o), apenas presenta capacidad alergénica o inmunogénica in vivo. Frente al acero quirúrgico (CrNiMo), el titanio tiene en el cociente de peso un 50% más de fuerza y mayor capacidad osteointegradora.(90)

Entre las ventajas que ofrece están su baja densidad, su excelente resistencia a la corrosión, una alta fuerza mecánica, gran elasticidad derivada de su bajo módulo de Young y un poder de osteointegración que carece de efectos tóxicos.(91,92) Debido a esta serie de ventajas, se han planteado una serie de modificaciones a su superficie para dotarle de nuevas capacidades. Entre ellas se encuentran procesos mecánicos (granallado, atrición), químicos (grabado

ácido, depósitos electroquímicos), técnicas físicas (espray de plasma) o una combinación de ellas. Por el contrario, algunas de las desventajas que presenta son una baja dureza que provoca una baja resistencia al desgaste y que algunas de sus aleaciones, además de presentar una buena adherencia celular, pueden presentar también un aumento de la adherencia bacteriana.(93)

La interacción de la superficie del titanio con su microentorno se puede dividir en cinco fases(93):

- Fase I: adsorción de moléculas de alto y bajo peso. La carga positiva del titanio es la responsable de la unión inicial a moléculas de bajo peso con carga negativa, a las que siguen grupos funcionales de moléculas de alto peso con carga negativa. En esta etapa dinámica, proteínas como la vitronectina o la albúmina, entre otras, están involucradas, mientras que los lípidos ocupan un papel secundario. Los enlaces son de tipo no covalente. El resultado de este proceso es una interfaz más o menos funcional preparada para unirse a las células.
- Fase II: en esta etapa ocurre la llamada “carrera por la superficie”. La superficie de titanio promueve la adherencia celular, sin diferenciar entre células huésped o bacteria. Por tanto, aquí se determina el futuro del implante entre la osteointegración y la infección. Los macrófagos M2 han sido relacionados con la osteointegración en esta fase.
- Fase III: las células unidas inicialmente se fijan a la superficie de titanio por acción de las proteínas de la matriz extracelular. Esta fase de acompaña de un cambio cualitativo y cuantitativo en la capa proteica que una implante y células

- Fase IV: en esta fase se inducen citoquinas intercelulares de proliferación y diferenciación, así como factores de crecimiento. Está controlada por las estructuras de la superficie del titanio y mediada por contactos celulares focales. Los contactos focales son estructuras dinámicas que unen el citoesqueleto a la matriz extracelular, permitiendo a las células responder a los estímulos del entorno.
- Fase V: cambios locales en el pH y la acumulación de calcio y fosfato conllevan la mineralización y osteointegración del implante. Aquí están involucrados principalmente osteoblastos y osteoclastos. Posteriormente, las fuerzas biomecánicas inducen la remodelación ósea.

A pesar de las propiedades que presentan los materiales empleados, el fracaso de los implantes todavía plantea un serio problema.

Entre las causas de fracaso que ha sido propuestas se encuentran la contaminación durante el acto quirúrgico la falta de integración del implante.

Como estrategias de prevención se han propuesto diversas medidas para disminuir la carga bacteriana del entorno quirúrgico durante el periodo perioperatorio, como la profilaxis antibiótica, las guías de práctica clínica en el quirófano o la identificación de factores de riesgo y optimización del paciente antes de la cirugía.

Poelstra et al.(94) definieron las primeras seis horas tras la cirugía como el “periodo decisivo”, dado que los patógenos que potencialmente pueden colonizar el implante se encuentran en un estado metabólicamente inactivo. Aquí reside la primera oportunidad para el sistema inmune del paciente de

neutralizar estos patógenos invasores, y donde los materiales capaces de liberar antibiótico entrarían en juego.

Una vez alcanzado el implante, la adhesión bacteriana consta de dos fase diferenciadas que dependen del tiempo(95)

- En la primera fase, que es reversible y dura unas 2 horas, se producen enlaces mediante fuerzas de Van de Waals y puentes de hidrógeno fundamentalmente.
- En la segunda fase, que es irreversible y tiene lugar unas 2-3 horas tras el implante del material, las bacterias se adhieren a través de enlaces covalentes e iónicas, hasta que consiguen formar el *biofilm*.

Se han descrito diversas técnicas y aleaciones a la hora de diseñar nuevos materiales con propiedades antibacterianas. Deben presentar una adecuada biocompatibilidad, una demostrada actividad antibacteriana que no interfiera con su capacidad de integración o fijación con cemento y una durabilidad y características mecánicas que aseguren su supervivencia.

Existen diversas maneras de conseguirlo; por un lado, se pueden modificar las propiedades físicas o químicas de la superficie del material y por otro se puede añadir nuevos recubrimientos a un material existente. Se han desarrollados materiales con propiedades antiadhesivas, otros que funcionan como agentes antimicrobianos y unos terceros que combinan ambos mecanismos. Las superficies se pueden distinguir entre bactericidas y eluyentes, así como los recubrimientos pueden diferenciarse entre degradables y no degradables. En términos de funcionalidad, se distinguen superficies monofuncionales y multifuncionales.

1.10.1 Materiales antiadherentes

Se basa en la prevención de la formación del *biofilm* sobre la superficie del material evitando la adherencia microbiana. Algunos autores proponen superficies hidrofílicas, altamente hidratadas sin carga.(96) Han demostrado eficacia in vitro, sin embargo, también interfieren en la integración del implante, ya que inhiben la interacción con las células del huésped, con lo que no serían válidos para materiales que requieran una osteointegración, como las prótesis no cementadas; en cambio podrían tener lugar para implantes como placas y tornillos.

Otra forma de prevenir la adhesión de las bacterias es actuar contra la interacción de las proteínas con la superficie y /o la interacción entre proteínas y bacterias. An et al. (97)demostraron en un modelo in vivo en conejos, mediante el uso de titanio recubierto con albúmina entrecruzada, la disminución de la adherencia bacteriana. Una de las claves de los recubrimientos es promover la integración e interacción con las células del huésped inhibiendo la adhesión bacteriana

1.10.2 Materiales con propiedades antibacterianas

Los enfoques clásicos, ya sean bactericidas o eluyentes, han presentado tradicionalmente problemas a la hora de fabricar implantes para cirugía ortopédica o traumatológica, ya sea por citotoxicidad, immunoactividad o genotoxicidad. La actividad antibacteriana puede interferir con la respiración, división o síntesis de la pared celular. Otras estrategias proponen la actuación sobre la señalización bacteriana o en la transición entre la fase planctónica o la

fase sésil; lo que aumentaría la ventana de actividad para la profilaxis antibiótica y la respuesta inmune.

Recubrimiento con metales antiinfecciosos

Esta actividad suele estar relacionada con la forma iónica o nano más que con el propio metal. Entre los metales más utilizados están la plata, que interfiere con el metabolismo celular y la permeabilidad de la membrana bacteriana; aunque potencialmente podría acumularse hasta alcanzar niveles tóxicos.

El cobre y el zinc tienen potencial efecto antibacteriano sobre un amplio espectro de bacterias, aunque también presentan efectos tóxicos.

El titanio y el cromo cobalto son dos de los materiales más utilizados en la fabricación de implantes usados en traumatología y cirugía ortopédica. Se han propuesto diversas maneras de implementar las propiedades del material; añadiendo a la superficie iones de plata o cobre o el recubrimiento con capas de dióxido de titanio.

Recubrimientos con materiales no metálicos.

Se ha propuesto el uso del selenio, que se une de forma covalente al titanio. Ha demostrado la prevención de la unión de *S. aureus* y *S. epidermidis* sin afectar la viabilidad de los osteoblastos.(98)

Recubrimientos con materiales orgánicos

Sustancias como los antibióticos, que interfieren en la síntesis proteica e inhibición de la pared celular de las bacterias, se han investigado como recubrimiento de implantes.(99–101)

Nanoestructuras y recubrimientos

La modificación de la nanoestructura de los materiales junto con otros tratamientos de la superficie de los materiales puede inhibir la adhesión bacteriana, permitiendo también la adición de polímeros y sustancias que inhiben a las bacterias sésiles y quiescentes, como las nanopartículas de plata, selenio, cobre o zinc.

Una de estas modificaciones es el anodizado. Consiste en generar una película de óxido de un grosor determinado utilizando un proceso electroquímico. Se suele utilizar una celda electroquímica con un ánodo, que es donde se desea generar la capa de óxido, y un cátodo, que es un material inerte dentro del baño de anodizado. De este modo, se conectan a una corriente eléctrica para generar una diferencia de voltaje. Respecto al anodizado del titanio, se ha conseguido crear nanoestructuras ordenadas y sencillas en el metal y sus aleaciones. Éstas se pueden modificar variando alguno de los parámetros de su elaboración, como el electrolito usado y su contenido, el voltaje empleado, la temperatura del baño, etc.(95)

La estructura de nanopartículas de plata(102), debido a sus propiedades antimicrobianas y su alto potencial de acción contra el *biofilm*, combinado una citotoxicidad relativamente baja, ha sido estudiada como media para lucha contra la infección asociada a implantes. Existen diversas maneras de fijar las nanopartículas de plata a la superficie de titanio: por reducción ultravioleta de iones de plata, por inmersión en un arco catódico de plasma de plata, mediante pulverización catódica con un magnetrón o asociada a alginato/chitosan. De todas estas formas ha conseguido buenos resultados en cuanto a actividad

antibacteriana en modelos in vitro, añadiendo en algunos casos también buenos datos respecto a la osteointegración y proliferación celular. La acción antibacteriana de la plata se consigue mediante diversos mecanismos: inactivación de enzimas bacterianas, interrupción de procesos metabólicos de la bacteria, alteración de la pared celular, alteración del potencial de la membrana plasmática, interacción con el material genético bacteriano o generación de especies de oxígeno reactivo. Entre los potenciales efectos secundarios descritos in vitro están el estrés oxidativo, mecanismos de *caballo de Troya* o daño genético. En estudios específicos en líneas celulares de estirpe osteoblástica, se llegó a la conclusión de que la dosis con efectos antibacterianos es una orden de magnitud menor que la necesaria para provocar efectos tóxicos en células humanas.(103)

1.10.3 Materiales multifuncionales

Combinan propiedades antiadhesivas que con péptidos que destruyan la bacteria por contacto y se integren en el hueso nativo, como un material que añada arginina-glicina-aspartato.(104)

1.10.4 PMMA y otras formas de administración antibiótica

local

Respecto al uso de PMMA como fuente de antibiótico en el sitio quirúrgico, presenta ciertos inconvenientes. Por un lado, parece que la cantidad de antibiótico que es capaz de liberar es relativamente pequeña. La propia presencia del material inhibe la respuesta inmune del huésped(105); además

está demostrado que las bacterias son capaces de colonizar la superficie del cemento in vivo.(106) Por último, al tratarse de un material que no es biodegradable, requiere de una cirugía para su retirada; ésta puede dejar espacios muertos que conlleven la formación de fístulas.

Para intentar evaluar la efectividad del cemento PMMA con vancomicina, Inzana et al.(107) diseñaron un experimento en ratones, realizando una osteotomía en un fémur al que previamente se le había colocado una placa con tornillos. Se utilizó una cepa de *S. aureus* bioluminiscente. En el hueco de la osteotomía se colocó un espaciador de PMMA, con o sin vancomicina; y a la mitad de los ratones se le administró vancomicina por vía sistémica. Los ratones que recibieron vancomicina local o sistémicamente no sufrieron gran patología, pero los efectos sobre la osteolisis y la colonización bacteriana solo fueron estadísticamente significativos en aquellos ratones que habían recibido vancomicina sistémica. De este modo, la liberación local de vancomicina no demostró aumentar el efecto de la sistémica. La liberación del antibiótico desde el cemento fue probablemente demasiado lenta y no alcanzó concentraciones suficientes.

Dado el número de inconvenientes que puede presentar el PMMA, se han propuestos otros tipos de materiales biodegradables que incorporen antibiótico.(108)

Diversas sustancias derivadas de tejidos biológicos, tales como el colágeno tipo I, el fibrinógeno e incluso coágulos de sangre autóloga se han utilizado como vehículos transportadores de antibiótico. Las tasas de elución en humanos son muy rápidas, liberándose toda la cantidad de antibiótico en

cuestión de horas o pocos días, mientras que en animales la liberación es más lenta. De todos ellos, las esponjas de colágeno tipo 1 de origen bovino han sido las más utilizadas, con tiempos de elución que varían entre 48 horas(109)

Los injertos y sustitutivos óseos, como el sulfato cálcico, fosfato tricálcico o hidroxiapatita, el o propio hueso esponjoso liofilizado han sido objeto de estudio, ya que promueven o son compatibles con la regeneración ósea. De todos ellos, el uso de injerto de hueso liofilizado con antibiótico es el que tiene unos resultados más contrastados.(110)

Por último, polímeros sintéticos, como la polilactida o la poliglicamida, incluyendo su presentación como microesferas, también ha sido estudiados, presentando buenos resultados in vitro.(111)

Como método alternativo de administración de antibiótico en caso de infección protésica, Whiteside et al.(112) han utilizado la infusión directa de antibiótico, utilizando catéteres tipo Hickman, en la rodilla del paciente tras un recambio de prótesis de rodilla. Se trataba de pacientes con infección de prótesis de rodilla, con antecedente de fracaso de un recambio en dos tiempos, o de infección por SARM. Así, los niveles intra-articulares de vancomicina se mantuvieron por encima de la CMI durante al menos 24 horas desde la administración del fármaco, mientras que los niveles intravenosos se mantuvieron en rango terapéutico, es decir, por encima de 10 µg/mL(113). Un método similar, utilizando amikacina, también con buenos resultados, fue descrito por Perry et al.(114)

2. HIPÓTESIS

«El científico no es aquella persona que da las respuestas correctas, sino aquél quien hace las preguntas correctas».

Claude Lévy-Strauss

La modificación de la aleación de $\text{Ti}_6\text{Al}_4\text{V}$ mediante anodizado que genere estructuras nanotubulares susceptibles de ser cargadas con antimicrobianos mejoraría las propiedades antiinfecciosas y de osteointegración de la misma.

3. OBJETIVOS

«Nuestros objetivos solo pueden alcanzarse a través de un vehículo de un plan, en el que debemos creer fervientemente, y sobre el cual debemos actuar enérgicamente. No hay otra ruta hacia el éxito.»

Pablo Ruiz Picasso

1-El empleo de una aleación de $\text{Ti}_6\text{Al}_4\text{V}$ anodizada con nanotubos cargados con antimicrobianos permitiría disminuir, e incluso evitar, el desarrollo de una infección en un modelo experimental *in vivo*.

2-El empleo de dicha aleación mejoraría además la osteointegración del implante en el mismo modelo.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

*«Trabaja como si con sólo tu trabajo pudieras
alcanzar la meta. »*

Juana de Arco

4.1 FABRICACIÓN DEL IMPLANTE

El implante que ha sido utilizado en este modelo está fabricado a partir de una aleación de titanio Ti_6Al_4V , con un grado ELI acorde al estándar ASTM F136-02S. Dicho material ha sido suministrado por Surgival (Valencia, España). Se han utilizado agujas de 3 mm de diámetro, cortadas longitudinalmente en barras de 2 cm, pulidas químicamente con una mezcla de HF (48 wt.%), HNO_3 (70 wt.%) y H_2O , con una proporción de 1:4:5, durante cinco minutos a temperatura ambiente, bajo una agitación continua a 400 rpm. Posteriormente fueron enjuagadas con agua destilada y secadas al aire. La superficie de trabajo fue de 2.54 cm^2 .

Tras un proceso de anodización en una pila equipada con dos electrodos, los nanotubos adquirieron diversas morfologías. Los electrolitos utilizados presentaban distintos voltajes, todos ellos controlados(115,116).

Concretamente, los nanotubos seleccionados poseen morfología de botella. El electrolito utilizado en su proceso de anodización se formaron contenía 1 M $NH_4H_2PO_4$ y 0.3 M NH_4F ; se usaron dos voltajes distintos: 10 V durante 30 min seguido de 20V durante 60 min(117).

Todos los electrolitos anodizantes fueron preparados utilizando reactivos químicos (Sigma Aldrich, MI). La temperatura fue controlada en todo momento, manteniéndose constante en 20°C . El cátodo seleccionado estaba compuesto por una malla de platino. Los voltajes se aplicaron usando un generador LAB/SM 1300 DC (ETPower Systems Ltd).

Para comprobar que la morfología de los nanotubos presentes en la capa de óxido era la deseada, se realizaron mediciones mediante un microscopio de emisión de electrones (FEG-SEM) usando un instrumento JSM6500F JEOL.

Las secciones libres de electrones fueron preparadas rascando la superficie del anodizado con un bisturí y recogiendo los restos de óxido en una rejilla TEM, usando un instrumento JEOL JEM 2010 operando a 200 keV.

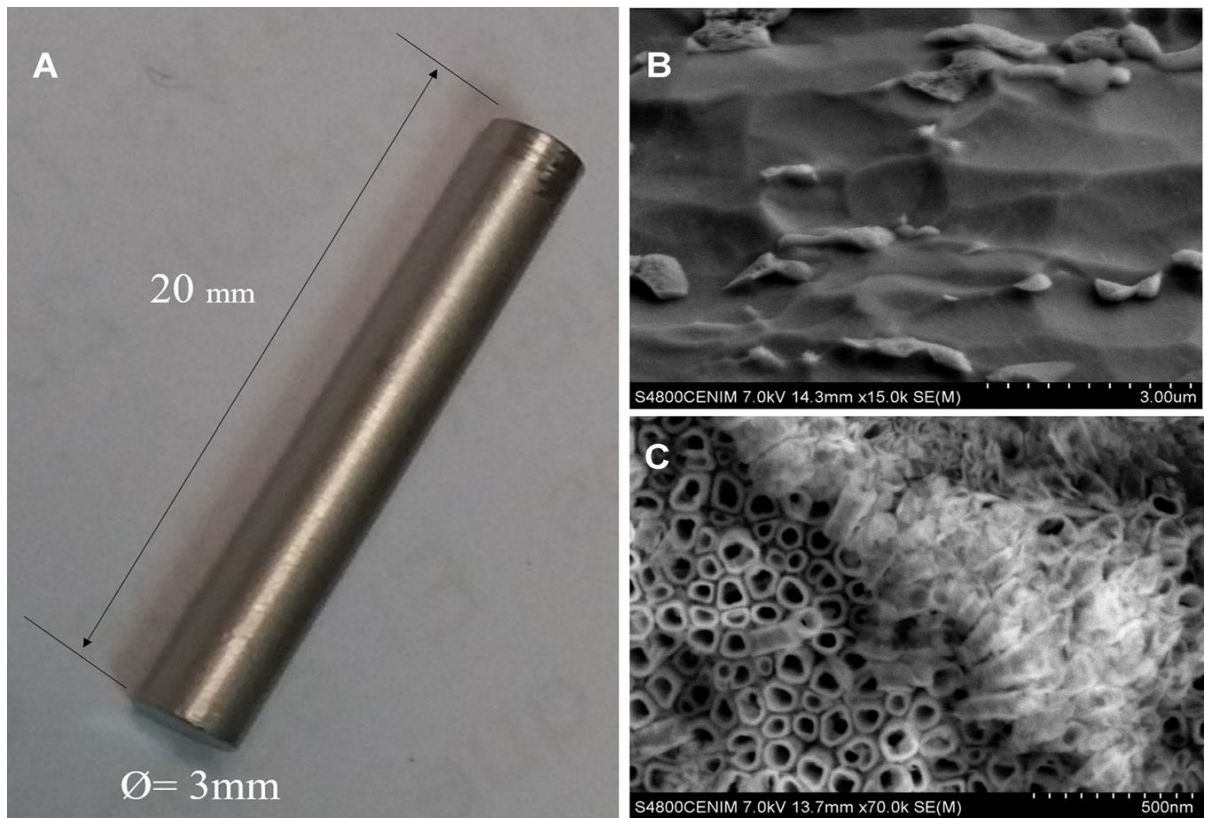


Fig 1 Los implantes utilizados en el modelo in vivo(A), y las superficies pulida(B) y con nanotubos(C)

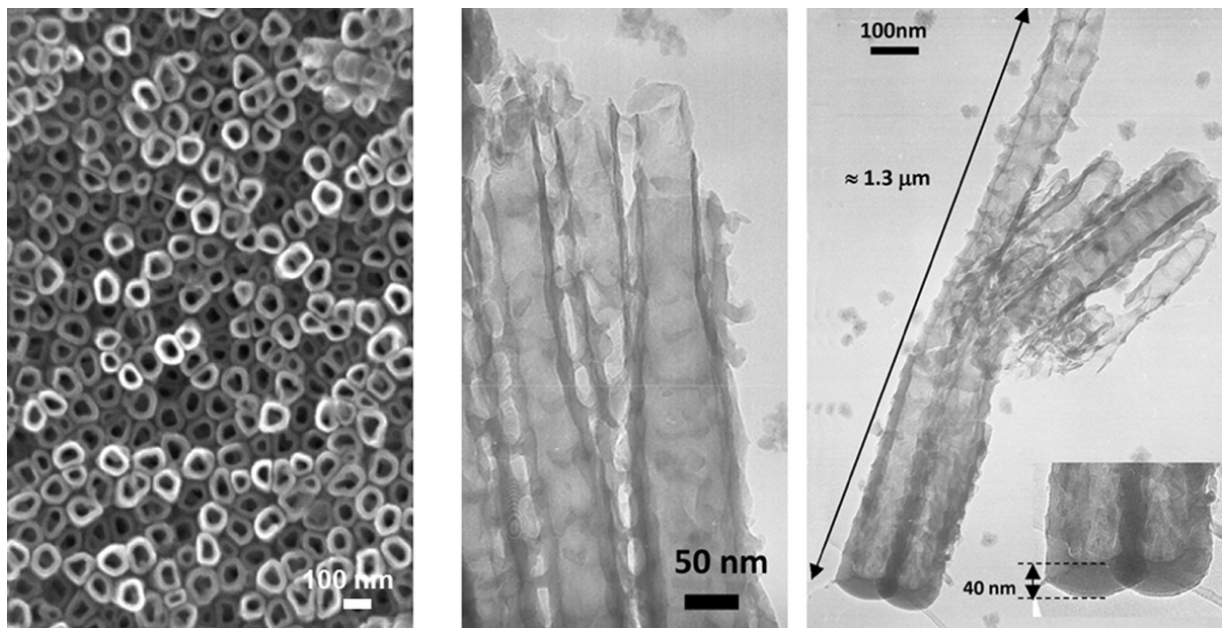


Fig 2 Vista micrográfica de los nanotubos (1: SEM y 2 y 3: TEM)(118)

Carga y liberación del antibiótico desde los nanotubos

La carga y liberación de los antibióticos desde los nanotubos fue evaluada siguiendo la metodología descrita previamente por Aguilera-Correa et al(119), donde la gentamicina y la vancomicina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) fueron añadidas por capas según el método descrito por Doadrio et al (120), preparando la solución de carga con 75mg de cada antibiótico en 20 ml de agua. Para la carga de la solución antibiótica en la aleación, los implantes fueron sujetos con alambres de platino, y sumergidos en un recipiente de polipropileno que contenía 20 ml de dicha solución bajo un agitado continuo durante 24 horas para alcanzar la máxima adsorción. Este proceso se llevó a cabo a temperatura ambiente. Posteriormente, se procedió al secado del implante en condiciones de vacío a 20°C de temperatura durante 24 horas. El perfil de liberación del fármaco se obtuvo sumergiendo las muestras en 20 ml de una solución tampón de 20 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ con un pH de 7 a 37°, bajo un agitado continuo.

La concentración de antibiótico en el líquido fase fue evaluada mediante cromatografía líquida de fase inversa de alto rendimiento (RP-HPLC). Las medidas se realizaron con un sistema de cromatografía líquida equipado con un módulo de separación Waters Alliance 2695, con un detector dotado de un conjunto de diodos de longitud de onda variable Waters 2996 y controlado por el software Millennium 32, en un horno con una temperatura de 37°C. Además, se empleó una columna de fase inversa X-Terra RP-18(Waters Instruments, Cerdanyola del Vallès, Cataluña, España). La fase móvil estaba compuesta por 10 wt.% acetonitrilo HPLC(Sigma-Aldrich) y 90 wt.% de agua HPLC (Sigma-Aldrich) (v/v).

Los antibióticos, sulfato de gentamicina (potencia = 635 µg/ml) y vancomicina (potencia 1,000 µg/ml) se obtuvieron de Sigma-Aldrich. La solución estándar interna para ambos antibióticos contenía 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, y 1 mg por ml de solución tampón.

El volumen de inyección fue de 40 µl y el ritmo de infusión fue de 1 ml/min; la gentamicina y la vancomicina fueron monitorizados a $\lambda=211\text{nm}$ y $\lambda=227\text{nm}$ respectivamente. El pico de concentración se obtuvo a 1.6 min en el caso de la gentamicina y 2.6 min para la vancomicina. La concentración de ambos se midió periódicamente a los 5, 15, 30, 60, 120, 180, 230, 240 y 420 minutos.

La cantidad total de antibiótico que contenían los nanotubos fue determinada utilizando la RP-HPLC y estimando la diferencia entre los miligramos que contenía la solución (75 mg de cada antibiótico) antes y después de la carga, con un resultado de 1.5 mg de vancomicina y 1.48 mg de gentamicina cuando se cargaban por separado y 1.4 de vancomicina y 1.45 de gentamicina cuando se cargaban juntos desde la misma solución.

Concentración antibiótica utilizando métodos de difusión de disco y bioquímico

Para el análisis cuantitativo de la carga de gentamicina se ha utilizado el método espectrofotométrico descrito por Frutos-Cabanillas et al (121), diluyendo 2.5 g de o-phtaldialdehído, 62.5 ml de metanol y 3 ml de 2-mercaptoetanol en 560 ml de borato de sodio, en una solución de agua destilada. Se almacenó en una botella marrón dentro de una cámara oscura durante al menos las 24 h

previas a su uso. La solución de gentamicina, el o-phtaldialdehído y el isopropanol(añadido para evitar la precipitación de los productos) fueron mezclados en proporciones similares, y el producto obtenido conservado durante 30 minutos a temperatura ambiente antes de su uso. El compuesto cromofórico obtenido presentó una absorbancia de 322nm.

La prueba de difusión en disco fue realizada usando el medio BD Difco™ Antibiotic medium 2 (BD, Franklin Lakes, NJ) y las pruebas de actividad biológica mediante el uso de *Bacillus subtilis* ATCC 6051 para la vancomicina. Para ello, 20 ml del medio fueron mezclados con 2 ml de inóculo bacteriano (3×10^8 CFU/ml) y depositados en una placa de Petri estéril de 90mm de diámetro. Se cargaron discos Whatman® para ensayo de antibióticos(Sigma-Aldrich) con 20 µl de diversas muestras. Se examinó la zona de inhibición y se estimó la concentración de antibiótico comparando con una curva estándar con las concentraciones conocidas de cada antibiótico. Este experimento fue realizado por triplicado para cada conjunto antibiótico-cepa.

Estudio histopatológico

Las piezas de Ti-6Al-4V se colocaron en placas de 12 pocillos antes de sembrar las células MC3T3-E1, con una densidad de 10,000 células/cm² en 2 ml de α-MEM, con suero bovino fetal 10%, 50mg/ml de ácido ascórbico, 10 mM de β-glicerol-2-fosfato y 1ml de penicilina-estreptomina 1%, incubándose en a 37°C en 5% CO₂. El medio fue reemplazado a diario.

La proliferación celular se midió añadiendo solución AlamarBlue® (BIO-RAD, Hercules, CA) al 10% (v/v) al cultivo celular tras 48 y 168 h de incubación,

siguiendo las instrucciones del fabricante. La absorbancia fue medida a 570 y 620 nm. El colorante utilizado también permitió medir la citotoxicidad, ya que es un marcador de actividad metabólica celular.

La mineralización de la matriz celular se midió con tinción Rojo Alizarin (Sigma-Aldrich) tras la incubación de las células MC3T3-E1 en el medio previamente descrito durante 10 días. La tinción se disolvió con cloruro de cetilpiridinio 10% en 10 mM de fosfato de sodio, pH 7, a una absorbancia de 620nm.

Para validar el efecto de la aleación en la diferenciación osteoblástica, se analizó la actividad de dos marcadores osteogénicos de diferenciación precoz y tardía (Runx2 y BGLAP) y el factor angiogénico VEGF mediante reacción en cadena de polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR).

La cuantificación relativa de la expresión genética se realizó usando RT-PCR. Se empleó el método descrito por Pfaffl (122) se utilizó para la cuantificación relativa, usando 18S como gen constitutivo y el CP Ti-6Al-4V como el material control.

4.2 CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL MODELO ANIMAL

Animales

Los animales utilizados en el modelo animal han sido conejos machos, albinos, de la raza New Zealand (*Oryctolagus cuniculus*), sanos, procedentes de la Granja San Bernardo (Granja Cunicola San Bernardo SI, Tulebras, Navarra). El

peso peroperatorio estaba comprendido entre 2.5 kg y 3kg. Se ha utilizado el número mínimo de animales necesario, siguiendo el principio de las tres R (reemplazo, reducción y refinamiento). Todas las intervenciones incluidas en el modelo experimental animal se han llevado a cabo en el Animalario del de Servicio de Experimentación Animal y Cirugía Experimental del Hospital Universitario de la Fundación Jiménez Díaz de acuerdo con lo establecido en el Real Decreto 53/2013 y con la aprobación del Área de Protección Animal de la Consejería de Medio Ambiente, Administración local y Ordenación territorial de la Comunidad de Madrid (PROEX 111/16). Los animales han permanecido durante todo el tiempo en el animalario del IIS-FJD, en jaulas individuales. Éstas constan de un dosificador de agua. Los animales han sido alimentados a diario con pienso, lechuga y zanahorias. Las jaulas han sido higienizadas a diario.

Todos los animales fueron estabulados de manera individual en jaulas dentro de una habitación climatizada a $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ con ciclos de luz-oscuridad de 12:12h

Inóculo

Se ha utilizado *S. aureus*. (Tabla 1). La cepa de fue aislada en un paciente de 62 años diagnosticado de una infección de prótesis de cadera. El aislamiento se llevó a cabo por el departamento de Microbiología Clínica del Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz.

Para cerciorarse de que la cepa fuera capaz de provocar una infección en conejo, se indujo la formación de *biofilm* en un cilindro de $\text{CPTi}_6\text{Al}_4\text{V}$ de 3 mm de diámetro y 2 cm de largo en una dilución 1:100 de una suspensión $0,5\pm 0,02$ McF en 5 mL de TSB+1% de glucosa, incubado a 100 rpm a 37°C a lo largo de una noche. Tras la incubación, el cilindro cubierto de *biofilm* se lavó tres veces

en SS y se implantó subcutáneamente en un conejo. A los 14 días, se extrajo el implante y el pus acumulado a su alrededor. El sonicado del implante y el pus recolectado se sembraron en agar triptona-soja sangre (Biomérieux, Marcy-l'Étoile, Francia) y se incubaron durante 24 h, tiempo tras el cual se obtuvo un crecimiento abundante de la cepa las cepas que colonizaban los diferentes implantes.

Valoración preoperatoria

Previamente a la cirugía, a los conejos se les realizó un examen físico, además de medir el peso y la temperatura.

<i>Staphylococcus aureus</i>		
Oxacilina	SENSIBLE	$\leq 0,25$
Clindamicina	SENSIBLE	$\leq 0,25$
Eritromicina	SENSIBLE	1
Gentamicina	SENSIBLE	$\leq 0,5$
Tobramicina	SENSIBLE	≤ 1
Penicilina G	SENSIBLE	0,06
Vancomicina	SENSIBLE	1
Fosfomicina	SENSIBLE	≤ 8
Teicoplanina	SENSIBLE	$\leq 0,5$
Cotrimoxazol	SENSIBLE	≤ 10
Levofloxacino	SENSIBLE	$\leq 0,12$
Linezolid	SENSIBLE	2
Daptomicina	SENSIBLE	0,25
Tigeciclina	SENSIBLE	$\leq 0,12$
Fusídico	SENSIBLE	$\leq 0,5$
Detección de cefoxitina	NEGATIVO	
Resistencia inducible a clindamicina	NEGATIVO	

Tabla 1. Antibiograma del *S. aureus* utilizado en el modelo animal

4.3 INTERVENCIÓN QUIRÚRGICA

La intervención quirúrgica del modelo *in vivo* está basada en el modelo previamente descrito por Cordero et al..(123) (Figura 3).

Anestesia

Como anestésico se utilizó una mezcla 2:1 de ketamina y xilazina, ajustada al peso de cada animal, y fue administrada por vía intramuscular. Se complementó durante la intervención con isoflurano al 2,5% por vía inhalatoria, de acuerdo con la tolerancia de cada animal. Antes de la intervención quirúrgica se procedió al rasurado de la piel de la región de la cadera del conejo, y se desinfectó la zona con clorhexidina alcohólica tintada al 2%(Bactiseptic Orange, Vesismín SL, Barcelona) (Figura 2. a).

Cirugía

El aislamiento del campo quirúrgico se llevó a cabo mediante paños fenestrados estériles (Barrier, Mölnycke Health Care, Gotheborg). La pelvis y el trocánter mayor fueron utilizados como referencias anatómicas. La intervención quirúrgica se llevó a cabo mediante un abordaje directo sobre el trocánter mayor (asterisco de la Figura 2. b), extendiéndose proximalmente unos 3 cm hacia la espina iliaca anterosuperior, disecando a través del tejido celular subcutáneo, la fascia superficial y el ligamento iliofemoral hasta alcanzar la cresta intertrocantérea. El fresado endomedular se realizó con una broca de 3,2 mm de diámetro (Figura 2. c) hasta alcanzar un mínimo de 2 cm de profundidad (Figura 2. d). Una vez finalizado el brocado el hueso, previo a la inoculación del patógeno, se aspiró sangre del canal endomedular para confirmar la entrada en el mismo, para a

continuación inyectar 100 µL de suero fisiológico 0,9% NaCl con o sin una concentración total de 10^6 UFC de *S. aureus*. Una vez inyectado el inóculo, se implantó el cilindro de Ti₆Al₄V según el grupo que le corresponda a cada animal hasta enrasar el implante con el orificio del fresado (Figura 2. e). Después procedió a secar el lecho quirúrgico con gasas estériles y se procedió al cierre por planos de la articulación utilizando puntos de colchonero horizontales de seda de 2-0 (Silkam, Braun Surgical, Rubí) (Figura 2. f). La incisión se cubrió con un apósito estéril cubierto de clorhexidina alcohólica tintada, fijada a la piel del animal por las cuatro esquinas con puntos simples de seda de 2-0, de modo que el conejo no tuviera acceso a la herida quirúrgica. Siguiendo el principio de las tres R, con el fin de reducir el número de animales a utilizar, se intervinieron los dos fémures de cada conejo, espaciando las cirugías una semana.

4.4 CONTROL POSTOPERATORIO

Tras la cirugía, cada conejo recibió analgesia postoperatoria con 0,2 mL de meloxicam por vía subcutánea durante los primeros cinco días. Transcurrido este tiempo, la administración de analgesia se basó en la evaluación del dolor que se realizó diariamente a cada animal.

De lunes a viernes, salvo festivos, se procedió a la evaluación del dolor-estrés y al control peso y temperatura de cada conejo, con el fin de velar por su estatus físico. La evaluación del dolor-estrés consistió en evaluar la presencia o ausencia de ocho comportamientos directamente relacionados con el dolor o el estrés en esta especie animal y el procedimiento quirúrgico al que fue sometido: presencia de paso cuidadoso o descarga en las patas delanteras, postura extendida, diarrea, estreñimiento, descarga ocular, protrusión de la

membrana nictitante, aspecto adormilado y cabeza girada hacia atrás. Ante una pérdida de peso continuada en el tiempo, se tomaron las medidas de refinamiento más apropiadas para incitar al animal a comer. Para ello, se les ofreció verduras frescas aptas para consumo humano (zanahoria, espinacas y mezclas de brotes tiernos) o golosinas (principalmente mermeladas).

Se han utilizado 20 animales en repartidos en cuatro grupos: un primer grupo con un implante de CP Ti₆Al₄V por fémur y sin infección (grupo CP Ti₆Al₄V), un segundo grupo con un implante de CP Ti₆Al₄V por fémur y con infección inducida por *S. aureus* (grupo CP Ti₆Al₄V Sa5), un tercer grupo con un implante de bNT Ti₆Al₄V por fémur y sin infección (bNT grupo Ti₆Al₄V GV), y un cuarto grupo un implante de bNT Ti₆Al₄V por fémur y con infección inducida por *S. aureus* (grupo bNT Ti₆Al₄V GV Sa5).

Transcurridas cuatro semanas desde la cirugía, se procedió al sacrificio del conejo. Como técnica de sacrificio se ha utilizado el tiobarbital sódico en inyección intracardiaca. El explante de la pieza se realizó en condiciones estériles usando el mismo abordaje descrito para el implante, ampliado hacia distal para facilitar la extracción del fémur completo. Posteriormente se separaron las muestras en dos grupos: pieza quirúrgica y tejido óseo.

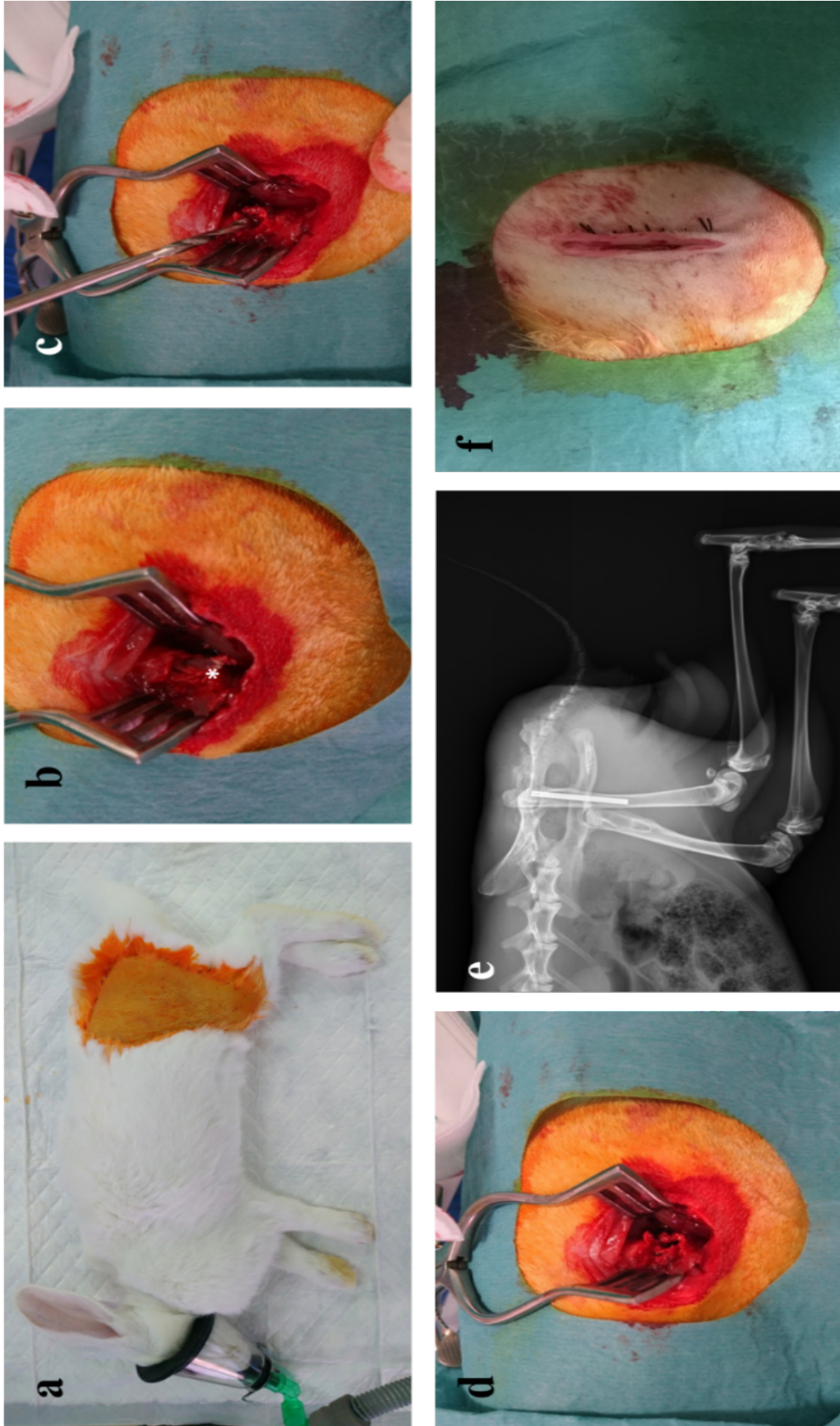


Fig 3. Resumen visual de algunos pasos del procedimiento quirúrgico en conejo (*Oryctolagus cuniculus*) albino de Nueva Zelanda.
a. Animal anestesiado con el área quirúrgica rasurada y desinfectada con clorhexidina alcohólica tintada. **b.** Trocánter mayor (asterisco) expuesto tras diseccionar piel, tejido subcutáneo, la fascia superficial y el ligamento iliofemoral. **c-d.** Brocado óseo en la cresta intertrocanterea. **e.** Radiografía del implante correctamente colocado intramedularmente en el agujero brocado en el fémur. **f.** Incisión quirúrgica suturada con puntos de colchonero horizontales y limpia con suero fisiológico estéril.

4.5 ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO

El hueso procedente del explante fue repartido en dos grupos: la de mejor calidad se destinó a los estudios anatomopatológicos y el resto a los estudios microbiológicos.

El estudio anatomopatológico se realizó mediante ciego simple. Cada muestra se fijó en una solución de formaldehído al 10% (Sigma-Aldrich, Missouri, EE. UU) durante 24 h antes de descalcificarlas en formaldehído al 10% con ácido nítrico al 10% (Sigma-Aldrich, Missouri, EE. UU) durante 24-36 h. Una vez descalcificado el tejido óseo se incluyó el material en parafina usando un procesador Leica ASP300 S (Wetzlar, Alemania) y se realizaron secciones de 3 µm de grosor con un micrótom. Los cortes histológicos se montaron sobre portas Superfrost™ (Fischer Scientific, NH) y se realizó una tinción histológica de hematoxilina-eosina usando un teñidor automático Dako CoverStainer (Agilent, Santa Clara, CA).

Se examinaron los cristales obtenidos, valorándose la osteointegración, la remodelación ósea y la osteomielitis de aquellos cortes donde se visualizó completamente la oquedad cilíndrica dejada por el implante.

La reacción de osteointegración se valoró según su osteointegración en tres grados (completa, parcial o ausente), y según el grosor medio de la membrana de interfase entre el hueso y el implante. Se ha definido como osteointegración completa a la formación de una estructura completa de trabéculas óseas, ya fuera de hueso trenzado-inmaduro o laminar-maduro, alrededor del implante, con escasa membrana de interfase restante. La osteointegración parcial se ha entendido como la formación focal de hueso con áreas sin osificar, donde la membrana de interfase ocupaba todavía la mitad del tejido periprotésico,

mientras que la ausencia de osteointegración se ha definido como la ausencia de formación de hueso, de forma que todo el tejido periprotésico hallado estaba formado por membrana de interfase. El grosor medio (μm) de la membrana de interfase se cuantificó mediante metraje microscópico, y se estimó como el valor medio comprendido entre el grosor máximo y mínimo de esta membrana desde la luz dejada por el implante hasta la primera línea de hueso/osteoblastos. No se tuvieron en cuenta los restos celulares que pudieran haber sido arrastrados durante el corte, ni las áreas donde el hueso laminar estaba en contacto directo con el cilindro protésico.

La remodelación ósea se valoró de forma binaria en función de la presencia de celularidad remodeladora (osteoblastos y osteoclastos) en las trabéculas de nueva formación más cercanas al implante.

Dentro de la osteomielitis, se distinguió entre osteomielitis aguda y crónica en la totalidad del hueso. La osteomielitis aguda se definió como la aparición de focos de secuestro y necrosis óseos con celularidad polimorfonuclear (PMN) acompañante en campos de gran aumento (CGA) (≥ 5 PMN/CGA), en áreas alejadas de la médula ósea, donde la hematopoyesis de la serie mieloide pudiera llevar a confusión. La osteomielitis crónica se interpretó como la presencia de focos de hueso esclerosado y restos de trabéculas secuestradas en relación con la reacción fibrosa del estroma, con o sin infiltrado inflamatorio crónico acompañante.

Se trató de un estudio simple ciego, ya que la anatomopatóloga que realizó el análisis desconocía el origen de las muestras.

4.6 ESTUDIO MICROBIOLÓGICO

Para el estudio microbiológico, el hueso se sumergió en 15 mL de tampón fosfato salino (Biomérieux, Marcy-l'Étoile, Francia) y se sonicó durante 5 min en un sonicador de baño de baja potencia. El sonificado resultante se diluyó en un banco de diluciones en base 10 y fue sembrado en agar sangre-chocolate (Biomérieux, Marcy-l'Étoile, Francia) a través del método de extensión en placa, que consiste en sembrar 100 μ L/placa de cada dilución. La concentración de bacterias se estimó como UFC/g de hueso y anejos. El implante se sonicó en 5 o 10 mL de tampón fosfato salino estéril (dependiendo de la longitud del implante, 5 mL para los implantes de 2 cm y 10 mL para los implantes de 4 cm) durante 5 min para liberar las bacterias adheridas y se estimó concentración como UFC/cm² de prótesis. Las placas fueron revisadas a las 24 y a las 48 h.

4.7 ESTUDIO ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se ha realizado utilizando el programa informático Stata Statistical Software: Release 11 (StataCorp 2009). Antes de realizar cualquier estudio estadístico, la normalidad de las series de datos fue evaluado con la prueba de Shapiro-Wilk. Cuando los datos cumplían una distribución normal se utilizó la *t* de Student para comparar los grupos de datos y un análisis de la varianza cuando se compararon más de dos grupos. Si los datos no cumplían una distribución normal se utilizó la prueba no-paramétrico de Wilcoxon para el contraste de dos grupos de datos, mientras que la prueba de Kruskal-Wallis se usó para el contraste de más de dos grupos de datos. Se estableció como significación estadística $p \leq 0.05$

La comparación del peso, temperatura y dolor se realizó a través de un modelo de regresión de efectos mixtos donde se tuvo en cuenta la dependencia por individuo de las variables a lo largo del tiempo.

Todos los datos están representados como media y desviación estándar para los datos que cumplen una distribución normal y como mediana y rango intercuartílico para los resultados que no cumplían la distribución normal.

5. RESULTADOS

*«La ciencia más útil es aquella cuyo fruto es
el más comunicable».*

Leonardo Da Vinci

5.1 CARGA ANTIBIÓTICA Y LIBERACIÓN DESDE LOS NANOTUBOS

La figura 4A muestra los resultados de la liberación in vitro de la gentamicina y la vancomicina desde los nanotubos mediante el uso del RP-HPLC, aplicando el modelo no lineal de Boltzmann descrito anteriormente. Los coeficientes de regresión (R^2) fueron 0.9669 y 0.9023 para la gentamicina y vancomicina respectivamente. Los valores de máxima liberación fueron obtenidos a los 230 minutos para ambos antibióticos. Desde ese punto, la degradación de los antibióticos impide el correcto análisis de las muestras. Este proceso comienza cuando la concentración medida con el HPLC disminuye. El porcentaje de liberación de antibióticos desde los nanotubos fue del 56% para la gentamicina (aproximadamente 829 μg por pieza) y del 10.66% para la vancomicina (aproximadamente 160 μg por pieza).

Los resultados obtenidos por el método del o-ftalaldehído para la gentamicina, y por el método biológico para gentamicina, se muestran en la figura 4B. Se puede observar como la concentración de gentamicina se mantiene constante durante todo el periodo de estudio, a pesar de que el HPLC detectó la degradación a partir de los 230 minutos. De la misma manera, la vancomicina mantiene su actividad bactericida a pesar de la degradación detectada.

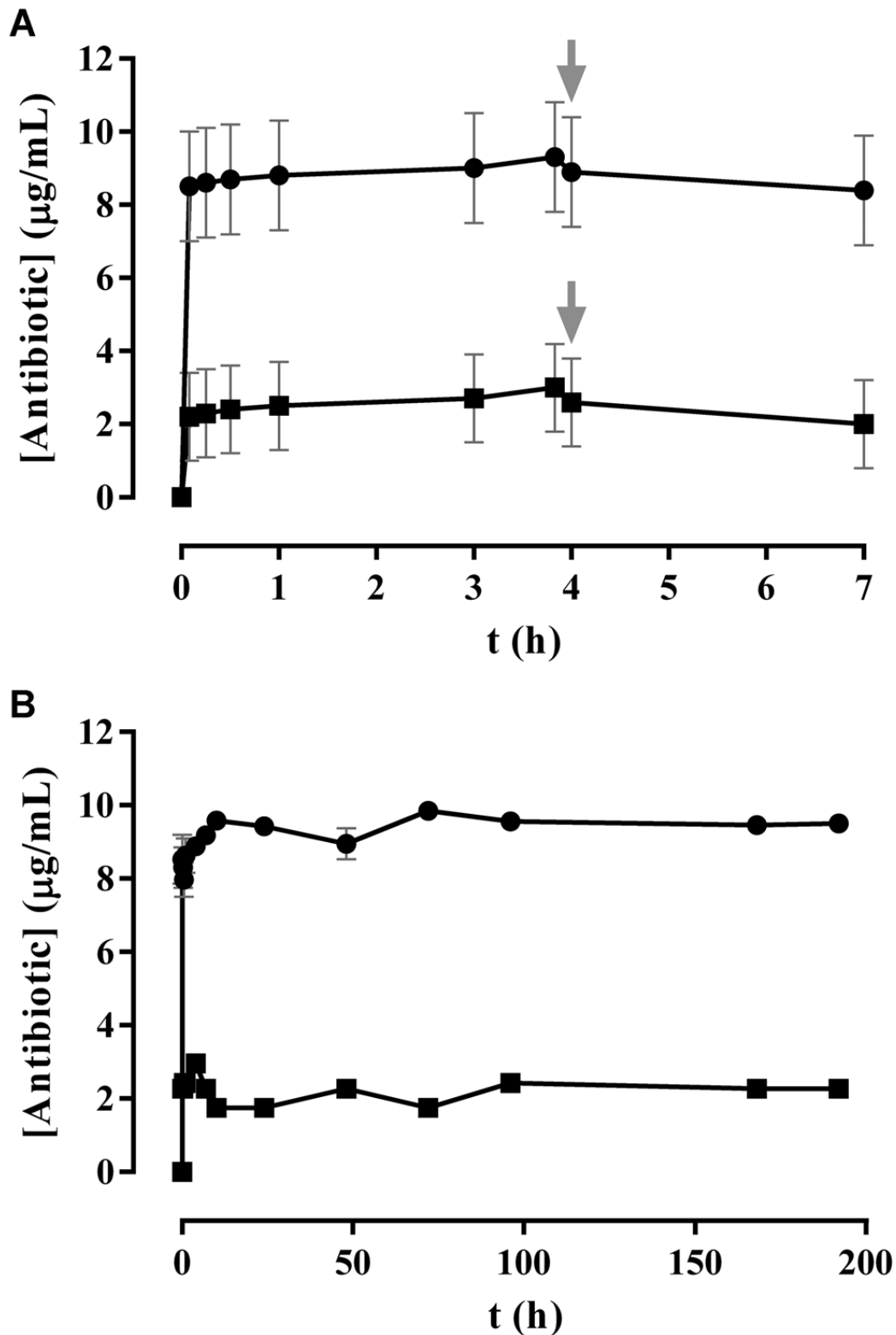


Fig. 4. (A) Curva de la liberación de la gentamicina (círculos) y de la vancomicina (cuadrados). El comienzo de la degradación empieza a los 230 minutos para los dos antibióticos. Las flechas indican el punto de inicio de la degradación. (B) La concentración en el tiempo de la gentamicina (medida con el método del o-phthaldialdehído) y de la vancomicina (medida con la actividad biológica) usando el *Bacillus subtilis* ATCC 6051.

5.2 ESTUDIO CELULAR

La proliferación celular de las células osteoblásticas se incrementó de forma significativa en los nanotubos bNT Ti₆Al₄V GV comparados con los CP Ti₆Al₄V ($p < 0.0001$). Por tanto, el porcentaje medio de proliferación celular en los nanotubos bNT Ti₆Al₄V GV comparados con los CP Ti₆Al₄V (normalizado al 100%) fue del 128% y 168% a las 48 y 168 horas respectivamente (Figura 5A). Además, la matriz de mineralización en los osteoblastos se incrementó de manera significativa en un 52% en los nanotubos bNT Ti₆Al₄V GV comparados con los CP Ti₆Al₄V ($p < 0.0001$) a los 10 días de cultivo (Fig. 5B). Igualmente, los nanotubos bNT Ti₆Al₄V GV aumentaron de forma significativa la expresión genética de todos los marcadores estudiados en las células MC3T3-E1 a las 120 horas, VEGF y BGLAP triplicaron su expresión ($p = 0.0026$ and $p < 0.0001$, respectivamente), mientras que RunX la aumentó en un 65% ($p < 0.0001$) (Fig. 4C).

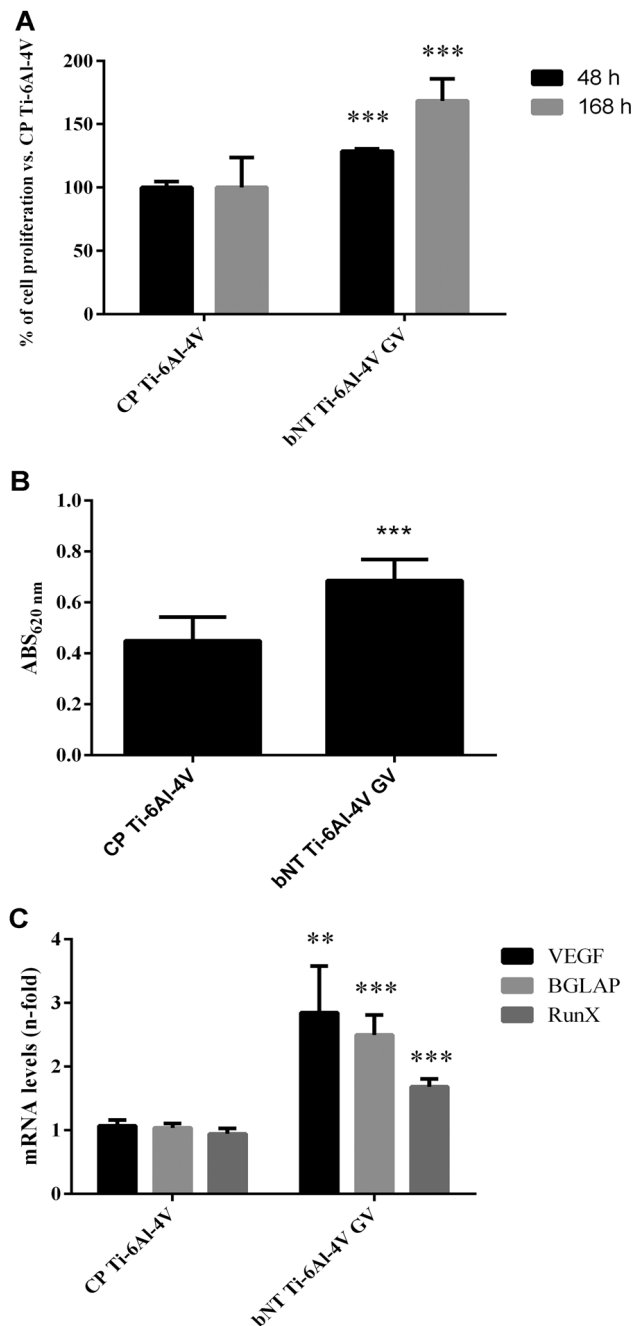


Fig.5. Proliferación de las células MCT3T3-E1 a las 48 y 168 h (A); mineralización de la matriz a las 120 horas de cultivo (B); y expresión genética del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y de los marcadores (BGLAP y Runx) (C) a las 120 horas, en presencia de CP Ti₆Al₄V y bNT Ti₆Al₄V GV. La barra representa la desviación estándar

. * $p < 0.05$ para la t de Student entre CP Ti₆Al₄V y bNT Ti₆Al₄V GV

** $p < 0.01$ para la t de Student entre CPTi₆Al₄V y bNT Ti₆Al₄V GV

*** $p < 0.001$ para la t de Student entre CP Ti₆Al₄V y bNT Ti₆Al₄V GV

5.3 ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO Y MICROBIOLÓGICO

Los resultados de examen histopatológico se muestran en la tabla 2 y en la Figura 6.

Se observaron tres tipos de respuesta al implante en el hueso: ausencia de osteointegración, osteointegración parcial y osteointegración total. Sólo un implante, CP Ti₆Al₄V, mostró ausencia total de osteointegración. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tipos de material, como tampoco se observaron en cuanto a la presencia o ausencia de infección($p > 0.05$). El grosor medio de la membrana de interfase en el grupo infectado CPTi₆Al₄V Sa5 fue seis veces mayor que en el CP Ti₆Al₄V no infectado($p = 0.0003$) cuando la osteointegración fue total, mientras que las diferencias no fueron estadísticamente significativas cuando la osteointegración fue parcial($p = 0.0898$). En cuanto al bNT Ti₆Al₄V GV, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tipos de osteointegración y la presencia o ausencia de infección($p > 0.05$).

Los resultados en cuanto a osteointegración obtenidos por la presencia de 5 o más osteoblastos por cada 10 campos de gran aumento, la formación de hueso no laminar la formación de hueso laminar no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre materiales o respecto a la presencia o ausencia de infección($p > 0.05$ o no evaluable)(Tabla 1). El remodelado óseo fue significativamente mayor en bNT Ti₆Al₄V GV (100%) comparado con CP Ti₆Al₄V (50%) ($p = 0.0195$).

La osteomielitis(tanto aguda como crónica) fue significativamente mayor en el grupo CPTi₆Al₄V Sa5($p = 0.0186$ y $p = 0.0352$, respectivamente)(Fig 6).

Una de las muestras de CPTi₆Al₄V presentó una osteomielitis crónica. De la misma forma, la osteomielitis fue significativamente mayor en bNT Ti₆Al₄V GV Sa5 ($p = 0.0468$), pero no en cuanto a osteomielitis crónica o aguda ($p = 0.1152$ and $p = 0.2791$, respectivamente). La proporción de osteomielitis, incluyendo tanto aguda como crónica, fue el doble en CPTi₆Al₄V Sa5 comparado con bNT Ti₆Al₄V GV Sa5, pero no fue estadísticamente significativa ($p = 0.1577$) (Tabla 2).

Los resultados del estudio microbiológico mostraron diferencias estadísticamente significativas entre CP Ti₆Al₄V Sa5 y bNT Ti₆Al₄V GV Sa5, en cuanto al número de bacterias aisladas del hueso y anexos y del implante ($p = 0.0022$ y $p = 0.0074$) (Figura 7). Los cultivos de la muestra de hueso del grupo CP Ti₆Al₄V que presentó osteomielitis crónica fueron negativos a las 120 horas de incubación.

		CP Ti ₆ Al ₄ V			bNT Ti ₆ Al ₄ V GV		
		Control ^a	Infectado ^a	P	Control ^a	Infectado ^a	P
Osteointegración							
Tipo							
	Ausente	1(10%)	0(0%)	0.4784	0(0%)	0(0%)	N.E
	Total	9(90%)	9(100%)	0.4784	10(100%)	10(100%)	N.E
	Parcial	1(10%)	3(30%)	0.2475	4(40%)	3(33,3%)	0.4304
Membrana de interfase							
	Total	31.74 (24.91-41.07)	194.64 (143.98-208.03)	0.0003	37.44 (25.59-61.06)	33.2 (22.79-98.15)	0.3121
	Parcial	182.68	764.9 (675.4-1172.74)	0.0898	963.25 (466-1330.15)	824.3 (714.5-1497.6)	0.2398
Osteoblastos		6(60%)	9(100%)	0.058	10(100%)	9(100%)	N.E
Hueso laminar		9(90%)	9(100%)	0.4784	10(100%)	9(100%)	N.E
Hueso no-laminar		5(50%)	8(88,8%)	0.0923	9(90%)	9(100%)	0.4784
Remodelación ósea		5(50%)	7(77,7%)	0.1096	10(100%)	9(100%)	N.E
Osteomielitis							
		1(10%)	6(66.6%)	0.0186	2(20%)	3(33,3%)	0.4454
	Aguda	0(0%)	4(44,4%)	0.0352	0(0%)	2(22,2%)	0.204
	Crónica	1(10%)	2(22,2%)	0.4604	2(20%)	1(11,1%)	0.4604

Tabla 2. Resultados del estudio histopatológico del hueso nuevo alrededor de los diferentes implantes con y sin infección de *S.aureus* en muestras descalcificadas teñidas con hematoxilina-eosina.

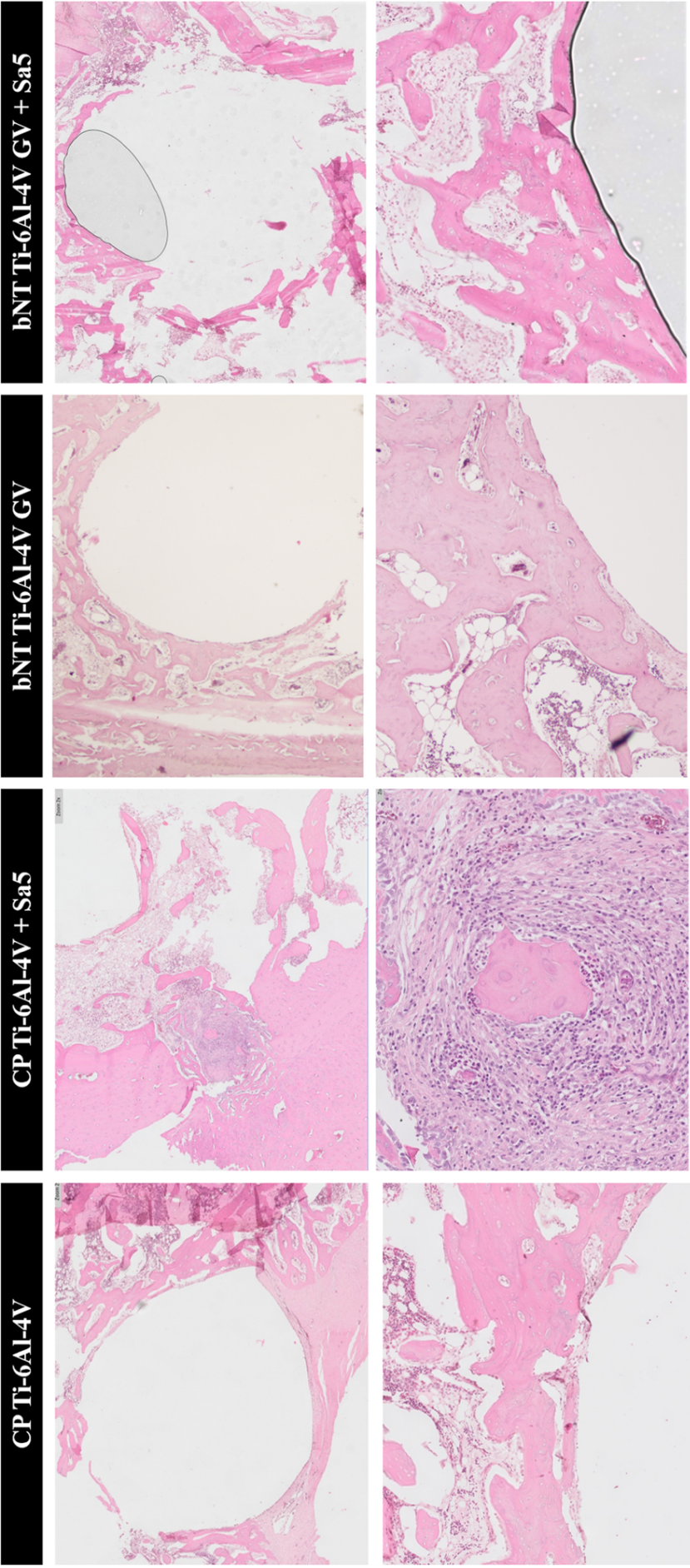


Fig. 6 Imágenes. representativas del estudio histopatológico de cada muestra de hueso periprotésico descalcificado teñido con hematoxilina-eosina a 40(fila superior) y 200(fila inferior) aumentos. La osteointegración y la ausencia de osteomielitis se pueden observar en CPTi₆Al₄V , bNT Ti₆Al₄V GV y bNT Ti₆Al₄V GV Sa5. En CP Ti₆Al₄V Sa5 se puede observar osteomielitis crónica.

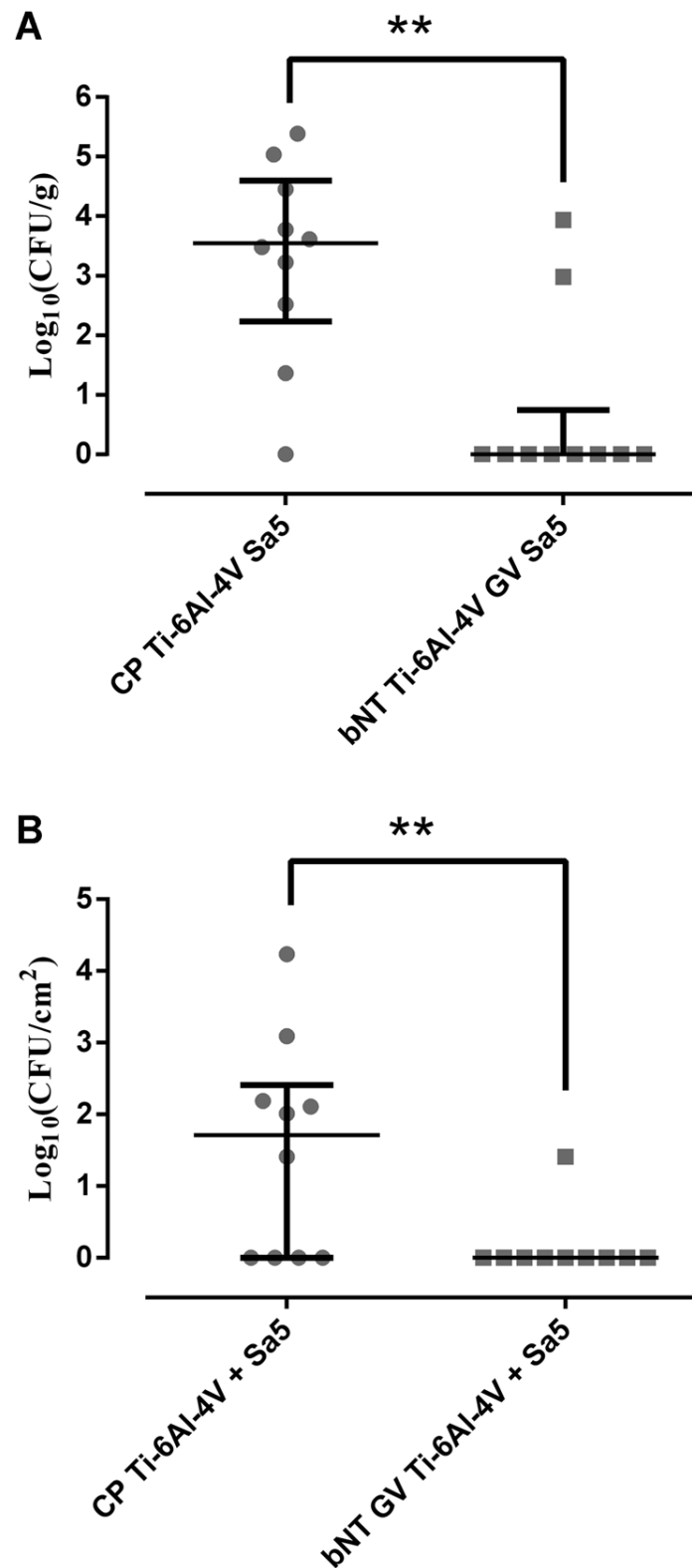


Fig. 7. Cantidad de bacteria(unidades formadoras de colonias, CFU) por gramo de hueso y anexos(A) de fémur y por centímetro cuadrado de implante(B) de cada grupo infectado. Las barras representan el rango intercuartílico.

**p < 0.01 para la prueba de Wilcoxon entre los grupos comparado

6. DISCUSIÓN

*«En algún lugar, algo increíble está esperando ser
conocido.»*

Karl Sagan

En este estudio, mostramos la efectividad de una aleación de titanio($\text{Ti}_6\text{Al}_4\text{V}$) con nanotubos en su superficie con forma de botella, cargados de gentamicina y vancomicina, tanto en la liberación de antibiótico como en la prevención de la infección asociada a implantes y la osteointegración de este. Para la carga del antibiótico se ha utilizado el método de inmersión, de fácil extrapolación a la producción industrial. De esta manera, los antibióticos liberados de forma local desde los nanotubos reducen la probabilidad de infección asociada y una hipotética resistencia a antibióticos.

En cuanto a los antibióticos más frecuentemente utilizados en los estudios con nanoestructuras de titanio se encuentran la gentamicina(119,124–126) y la vancomicina(127,128), aunque otros antibióticos como la penicilina y la estreptomina, así como compuestos tales como péptidos(129) o amonio de hidroxipropiltrimetilo(124) también han sido empleados en diversos estudios. La utilización de antibióticos en monoterapia para el tratamiento de las infecciones protésicas se asocia al desarrollo de resistencias antibióticas; el uso combinado de manera local de dos antibióticos podría prevenir la generación de éstas.

La elución de vancomicina y gentamicina desde las distintas capas donde se encuentran los nanotubos fue muy similar. Transcurridos 230 minutos desde la colocación del implante, la liberación se estabiliza para ambos antibióticos(Fig. 4A). Esto se debe a un mecanismo de difusión tipo Fickian, ya descrito en otros biomateriales, como silicatos mesoporosos(120), y otras aleaciones de TiO_2 con nanotubos cargados con gentamicina(124) o vancomicina(119,128,130,131) . Desde ese momento, la degradación de los antibióticos se estudió mediante el HPLC. Esta degradación se debe al

mecanismo hidrolítico que sufren ambos antibióticos en las condiciones de nuestro ensayo(119); debido a la oxidación de los grupos amino e hidroxilo en el caso de la gentamicina(132) que termina en la escisión-bajo las condiciones oxidantes de nuestro modelo(37°C con 5% CO₂)(133)- ; y a la cristalización térmica que sufre la vancomicina de forma concomitante(134). Esta degradación hidrolítica ha sido descrita en este mismo antibiótico en otros estudios en los que se liberaba desde nanoestructuras de titanio(119). A pesar de esto, el método biológico utilizado demuestra de ambos antibióticos degradados continúan siendo activos en el tiempo(Fig. 4B). Por lo tanto, el efecto protector de los nanotubos permanece activo durante al menos las primeras cuatro horas desde la cirugía. Desafortunadamente, el uso de un horno de vacío en el proceso obliga a realizar la carga de los antibióticos antes de la cirugía.

El estudio histopatológico muestra que el grupo bNT Ti₆Al₄V GV mejora las propiedades y la citocompatibilidad de manera significativa, comparado con CP Ti₆Al₄V (Fig. 4). Los implantes de bNT Ti₆Al₄V GV presentaron mayor proliferación celular, mineralización de la matriz y expresión de genes de diferenciación, de una manera similar a otras nanoestructuras que utilizaban la anodización de superficie, y dopadas con flúor, como las capas nanoporosas de óxido fabricadas en la aleación Ti₆Al₄V(135). Estos resultados son consistentes con los de otros estudios realizados, que subrayan la citocompatibilidad de la gentamicina(126,130,136) y la vancomicina(128)

Nuestro estudio in vivo demuestra además que la aleación bNT Ti₆Al₄V puede prevenir la infección asociada a implantes causada por *S. aureus*, cuando la

comparamos con el pulido químico tradicional de CPTi₆Al₄V. Este hecho se apoya en resultados microbiológicos e histopatológicos(Fig. 7).

A nivel histopatológico, la membrana de interfaz es el *gold standard* para el diagnóstico de infección asociada a implantes(137). Los altos valores del grosor de la membrana de interfaz en las muestras con osteointegración parcial en ausencia de infección se podrían deber a la diferencia entre el diámetro del implante(3mm) y la broca utilizada en el fresado del canal(3.2mm), así como por la ausencia de estímulo mecánico en nuestro modelo(138). Además, altos valores del grosor de la membrana de interfaz en las muestras con osteointegración parcial y presencia de infección se relacionan de forma directa con la presencia de *S. aureus* en la superficie del implante y la inflamación secundaria a la infección. Llama la atención que una muestra procedente del grupo CPTi₆Al₄V presentó osteomielitis crónica pero los cultivos microbiológicos fueron negativos. A la vista de este resultado, podemos asegurar que la osteomielitis no fue causada por *S. aureus*(o no al menos por la cepa utilizada), siendo posiblemente secundaria a una contaminación procedente de la piel del conejo, que no son susceptible de crecimiento en medios de cultivo empleados en nuestro entorno de trabajo(medios para anaerobios, por ejemplo).

El hueso en contacto con la superficie del implante sufre un remodelado que comienza justo después de la intervención. La transformación del hueso maduro peri-implante se confirma mediante la presencia de zonas intramedulares que contienen osteoclastos, osteoblastos, células

mesenquimales y estructuras vasculares y linfáticas en la zona de contacto con el implante(139).

La proporción de remodelado óseo bNT Ti₆Al₄V GV fue significativamente mayor que alrededor del grupo CP Ti₆Al₄V(p< 0.05). El remodelado óseo activo detectado en los grupos no infectados está mediado por osteoclastos y osteoblastos, que interaccionan de formas sincronizada para favorecer la osteointegración inicial del hueso esponjoso alrededor del implante, tras lo que será reemplazado por hueso compacto(140).

El estudio microbiológico mostró que el grupo bNT Ti₆Al₄V GV disminuye el número de bacterias aisladas tanto en el hueso como en el implante(Fig. 7). En este sentido, nuestros resultados son consistentes con otros estudios in vitro, que usan distintos biomateriales cargados de antibiótico, tales como aleaciones(125–128,130,136), polímeros(141–144) y cerámicas (145–147); de forma eficiente contra diferentes tipos de estafilococos. Pero sobre todo, son consistentes con otros estudios in vivo , que utilizan aleaciones de titanio cargada de vancomicina(128) y gentamicina(31)), y que han demostrado su eficacia para prevenir la infección por *S. aureus*(31,128)

Sin embargo, la principal diferencia entre nuestro estudio y el resto radica en las diferencias en el abordaje terapéutico; dado que nuestro método se intenta asemejar a la práctica clínica habitual y presenta mayor capacidad de prevenir posibles resistencias antibióticas asociadas a la terapia local. Por lo tanto, la aleación bNT Ti₆Al₄V GV podría usarse no sólo en la prevención de la infección asociada a implante sino como tratamiento de la infección protésica.

En la prevención, podría igualar la capacidad antibacteriana del cemento con antibiótico(148,149), además favorecería la osteointegración y evitaría el aflojamiento en comparación con el mencionado cemento(149). Como tratamiento local, podría sustituir a otros materiales liberadores de antibiótico(cuentas de MMA, sulfato cálcico, bolas, hebras de colágeno, etc)(150) que son empleados habitualmente como espaciadores(151) en recambios de dos tiempos. También se podría aplicar su uso en recambios en un tiempo, disminuyendo por tanto el coste y total y número de intervenciones en comparación al recambio en dos tiempos(152).

En conclusión, la aleación bNT Ti₆Al₄V GV cargada con una mezcla de gentamicina y vancomicina utilizando el método de inmersión, es un biomaterial prometedora con buena citocompatibilidad, osteointegración y propiedades bactericidas a nivel local contra *S. aureus*, debido a la liberación mantenida de los antibióticos en las primeras dos horas tras la cirugía. Esto proporcionaría una actividad contra las bacterias en fase planctónica y adheridas al implante en las primeras horas tras la intervención, y podría prevenir la formación de *biofilm* en la superficie del implante. Para futuros postulados, otras combinaciones de antibióticos podrían ser utilizadas para la prevención de infecciones asociadas a implantes causadas por microorganismos gram positivos o gram negativos.

7. CONCLUSIONES

*«El éxito es aprender a ir de fracaso en
fracaso sin desesperarse. »*

Winston Churchill

1-La aleación $\text{Ti}_6\text{Al}_4\text{V}$ con nanotubos cargados con vancomicina y gentamicina ha demostrado ser efectiva a la hora de prevenir la infección por *S. aureus* en un modelo experimental *in vivo* en conejos.

2- La aleación $\text{Ti}_6\text{Al}_4\text{V}$ con nanotubos cargados con vancomicina y gentamicina mejora la capacidad de osteointegración del implante.

3- La aleación $\text{Ti}_6\text{Al}_4\text{V}$ con nanotubos permite cargar antibióticos con capacidad antibacteriana demostrada y potencialmente de forma individualizada

8. BIBLIOGRAFÍA

*«La nueva información hace posible las
nuevas ideas. »*

Zig Ziglar

1. Bozic KJ, Katz P, Cisternas M, Ono L, Ries MD, Showstack J. Hospital resource utilization for primary and revision total hip arthroplasty. *J Bone Joint Surg Am*. 2005 Mar;87(3):570-6.
2. Hatz D, Anoushiravani AA, Chambers MC, El-Othmani MM, Saleh KJ. Approach to Decrease Infection Following Total Joint Arthroplasty. *Orthop Clin North Am*. 2016 Oct;47(4):661-71
3. Kapadia BH, Berg RA, Daley JA, Fritz J, Bhavre A, Mont MA. Periprosthetic joint infection. *Lancet*. 2016 Jan 23;387(10016):386-394.
4. Kurtz SM, Lau EC, Son MS, Chang ET, Zimmerli W, Parvizi J. Are We Winning or Losing the Battle With Periprosthetic Joint Infection: Trends in Periprosthetic Joint Infection and Mortality Risk for the Medicare Population. *J Arthroplasty*. 2018 Oct;33(10):3238-3245.
5. Fehring TK, Fehring KA, Hewlett A, Higuera CA, Otero JE, Tande A. What's New in Musculoskeletal Infection. *J Bone Joint Surg Am*. 2019 Jul 17;101(14):1237-1244.
6. Kheir MM, Rondon AJ, Woolsey A, Hansen H, Tan TL, Parvizi J. Infection Following Total Joint Arthroplasty Is the Main Cause of Litigation: Data From One Metropolitan Area. *J Arthroplasty*. 2018 May;33(5):1520-1523.

7. Metsemakers WJ, Kuehl R, Moriarty TF, Richards RG, Verhofstad MHJ, Borens O, Kates S, Morgenstern M. Infection after fracture fixation: Current surgical and microbiological concepts. *Injury*. 2018 Mar;49(3):511-522.
8. Benito N., Esteban J., Horcajada J.P., Ribera A., Soriano A., Sousa R. (2018) Epidemiology of Prosthetic Joint Infection. In: Peel T. (eds) *Prosthetic Joint Infections*. Springer, Cham
9. Cordero-Ampuero J, de Dios M. What are the risk factors for infection in hemiarthroplasties and total hip arthroplasties? *Clin Orthop Relat Res*. 2010 Dec;468(12):3268-77.
10. Castano-Betancourt MC, Fruschein Annichino R, de Azevedo E Souza Munhoz M, Gomes Machado E, Lipay MV, Marchi E. Identification of high-risk groups for complication after arthroplasty: predictive value of patient's related risk factors. *J Orthop Surg Res*. 2018 Dec 29;13(1):328.
11. Li S, Luo X, Sun H, Wang K, Zhang K, Sun X. Does Prior Bariatric Surgery Improve Outcomes Following Total Joint Arthroplasty in the Morbidly Obese? A Meta-Analysis. *J Arthroplasty*. 2019 Mar;34(3):577-585.
12. Marmor S, Kerroumi Y. Patient-specific risk factors for infection in arthroplasty procedure. *Orthop Traumatol Surg Res*. 2016 Feb;102(1 Suppl):S113-9

13. Singh JA. Smoking and outcomes after knee and hip arthroplasty: a systematic review. *J Rheumatol*. 2011 Sep;38(9):1824-34.
14. Sporer SM, Rogers T, Abella L. Methicillin-Resistant and Methicillin-Sensitive *Staphylococcus aureus* Screening and Decolonization to Reduce Surgical Site Infection in Elective Total Joint Arthroplasty. *J Arthroplasty*. 2016 Sep;31(9 Suppl):144-7.
15. Parvizi J, Shohat N, Gehrke T. Prevention of periprosthetic joint infection: new guidelines. *Bone Joint J*. 2017 Apr;99-B(4 Supple B):3-10.
16. Vijaysegaran P, Knibbs LD, Morawska L, Crawford RW. Surgical Space Suits Increase Particle and Microbiological Emission Rates in a Simulated Surgical Environment. *J Arthroplasty*. 2018 May;33(5):1524-1529.
17. King JD, Hamilton DH, Jacobs CA, Duncan ST. The Hidden Cost of Commercial Antibiotic-Loaded Bone Cement: A Systematic Review of Clinical Results and Cost Implications Following Total Knee Arthroplasty. *J Arthroplasty*. 2018 Dec;33(12):3789-3792.
18. Chen CT, Ng KJ, Lin Y, Kao MC. Red man syndrome following the use of vancomycin-loaded bone cement in the primary total knee replacement: A case report. *Medicine (Baltimore)*. 2018 Dec;97(51):e13371.

19. Riemenschneider K, Diiorio DA, Zic JA, Livingood MR, Fine JD, Powers JG, Zwerner JP, Tkaczyk E. Drug-induced linear IgA bullous dermatosis in a patient with a vancomycin-impregnated cement spacer. *Cutis*. 2018 Apr;101(4):293-296.
20. Ernest EP, Machi AS, Karolcik BA, LaSala PR, Dietz MJ. Topical adjuvants incompletely remove adherent *Staphylococcus aureus* from implant materials. *J Orthop Res*. 2018 Jun;36(6):1599-1604.
21. Tande AJ, Patel R. Prosthetic joint infection. *Clin Microbiol Rev*. 2014 Apr;27(2):302-45.
22. Peel TN, Cheng AC, Buising KL, Choong PF. Microbiological aetiology, epidemiology, and clinical profile of prosthetic joint infections: are current antibiotic prophylaxis guidelines effective? *Antimicrob Agents Chemother*. 2012 May;56(5):2386-91.
23. Esteban J, Sorlí L, Alentorn-Geli E, Puig L, Horcajada JP. Conventional and molecular diagnostic strategies for prosthetic joint infections. *Expert Rev Mol Diagn*. 2014 Jan;14(1):83-96.
24. Donlan RM. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis*. 2002 Sep;8(9):881-90.

25. Gomez-Urena EO, Tande AJ, Osmon DR, Berbari EF. Diagnosis of Prosthetic Joint Infection: Cultures, Biomarker and Criteria. *Infect Dis Clin North Am.* 2017 Jun;31(2):219-235.

26. Lebeaux D, Chauhan A, Rendueles O, Beloin C. From in vitro to in vivo Models of Bacterial Biofilm-Related Infections. *Pathogens.* 2013 May 13;2(2):288-356.

27. Magana M, Sereti C, Ioannidis A, Mitchell CA, Ball AR, Magiorkinis E, Chatzipanagiotou S, Hamblin MR, Hadjifrangiskou M, Tegos GP. Options and Limitations in Clinical Investigation of Bacterial Biofilms. *Clin Microbiol Rev.* 2018 Apr 4;31(3).

28. Ehrlich GD, Veeh R, Wang X, Costerton JW, Hayes JD, Hu FZ, Daigle BJ, Ehrlich MD, Post JC. Mucosal biofilm formation on middle-ear mucosa in the chinchilla model of otitis media. *JAMA.* 2002 Apr 3;287(13):1710-5.

29. Liu J, Prindle A, Humphries J, Gabalda-Sagarra M, Asally M, Lee DY, Ly S, Garcia-Ojalvo J, Suel GM. 2015. Metabolic co-dependence gives rise to collective oscillations within biofilms. *Nature* 523-550–554.

30. Kostakioti M, Hadjifrangiskou M, Hultgren SJ. 2013. Bacterial biofilms-development, dispersal, and therapeutic strategies in the dawn of the postantibiotic era. *Cold Spring Harb Perspect Med* 3-a010306.

31. Yang Q, Phillips PL, Sampson EM, Progulske-Fox A, Jin S, Antonelli P, Schultz GS. 2013. Development of a novel ex vivo porcine skin explant model for the assessment of mature bacterial biofilms. *Wound Repair Regen* 21:704 –714
32. Al-Ishaq R, Armstrong J, Gregory M, O'Hara M, Phiri K, Harris LG, Rohde H, Siemssen N, Frommelt L, Mack D, Wilkinson TS. Effects of polysaccharide intercellular adhesin (PIA) in an ex vivo model of whole blood killing and in prosthetic joint infection (PJI): A role for C5a. *Int J Med Microbiol*. 2015 Dec;305(8):948-56.
33. Wolcott RD, Rumbaugh KP, James G, Schultz G, Phillips P, Yang Q, Watters C, Stewart PS, Dowd SE. 2010. Biofilm maturity studies indicate sharp debridement opens a time-dependent therapeutic window. *J Wound Care* 19:320 –328.
34. Gristina AG, Naylor P, Myrvik Q. Infections from biomaterials and implants: a race for the surface. *Med Prog Technol*. 1988-1989;14(3-4):205-24.
35. Martinez-Perez M, Perez-Jorge C, Lozano D, Portal-Nuñez S, Perez-Tanoira R, Conde A, Arenas MA, Hernandez-Lopez JM, de Damborenea JJ, Gomez Barrena E, Esbrit P, Esteban J. Evaluation of bacterial adherence of clinical isolates of *Staphylococcus* sp. using a competitive model: An in vitro approach to the "race for the surface" theory. *Bone Joint Res*. 2017 May;6(5):315-322.

36. Perez-Tanoira R, Aarnisalo AA, Eklund KK, Han X, Soininen A, Tiainen V-M, Esteban J, Kinnari TJ. Prevention of Biomaterial Infection by Preoperative Incubation with Human Cells. *Surgical Infections*. 2017. 18 (3)- 336-344.
37. Valour F, Trouillet-Assant S, Rasigade JP, Lustig S, Chanard E, Meugnier H, Tigaud S. Staph- ylococcus epidermidis in orthopedic device infections the role of bacterial internalization in human osteoblasts and biofilm formation. *PLoS One* 8-e67240..pdf
38. John G, Becker J, Schwarz F. 2016. Effectivity of air-abrasive powder based on glycine and tricalcium phosphate in removal of initial biofilm on titanium and zirconium oxide surfaces in an ex vivo model. *Clin Oral Investig* 20-711–719
39. Mahmud T, Lyons MC, Naudie DD, Macdonald SJ, McCalden RW. Assessing the gold standard: a review of 253 two-stage revisions for infected TKA. *Clin Orthop Relat Res*. 2012 Oct;470(10):2730-6.
40. Biring GS, Kostamo T, Garbuz DS, Masri BA, Duncan CP. Two-stage revision arthroplasty of the hip for infection using an interim articulated Prostalac hip spacer: a 10- to 15-year follow-up study. *J Bone Joint Surg Br*. 2009 Nov;91(11):1431-7.

41. Pfang BG, García-Cañete J, García-Lasheras J, Blanco A, Auñón Á, Parron-Camero R, Macías-Valcayo A, Esteban J. Orthopedic Implant-Associated Infection by Multidrug Resistant Enterobacteriaceae. *J Clin Med*. 2019 Feb 8;8(2). pii: E220.
42. Cobo J, Del Pozo JL. Prosthetic joint infection: diagnosis and management. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2011 Sep;9(9):787-802.
43. Saeed K. Diagnostics in prosthetic joint infections. *J Antimicrob Chemother*. 2014 Sep;69 Suppl 1:i11-9.
44. Ghanem E, Parvizi J, Burnett RS, Sharkey PF, Keshavarzi N, Aggarwal A, Barrack RL. Cell count and differential of aspirated fluid in the diagnosis of infection at the site of total knee arthroplasty. *J Bone Joint Surg Am*. 2008 Aug;90(8):1637-43.
45. Parvizi J, Jacovides C, Antoci V, Ghanem E. Diagnosis of periprosthetic joint infection: the utility of a simple yet unappreciated enzyme. *J Bone Joint Surg Am*. 2011 Dec 21;93(24):2242-8.
46. Wyatt MC, Beswick AD, Kunutsor SK, Wilson MJ, Whitehouse MR, Blom AW. The Alpha-Defensin Immunoassay and Leukocyte Esterase Colorimetric Strip Test for the Diagnosis of Periprosthetic Infection: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Bone Joint Surg Am*. 2016 Jun 15;98(12):992-1000.

47. Frangiamore SJ, Gajewski ND, Saleh A, Farias-Kovac M, Barsoum WK, Higuera CA. α -Defensin Accuracy to Diagnose Periprosthetic Joint Infection- Best Available Test? *J Arthroplasty*. 2016 Feb;31(2):456-60.
48. Parvizi J, Tan TL, Goswami K, Higuera C, Della Valle C, Chen AF, Shohat N. The 2018 Definition of Periprosthetic Hip and Knee Infection: An Evidence-Based and Validated Criteria. *J Arthroplasty*. 2018 May;33(5):1309-1314.e2.
49. Schäfer P, Fink B, Sandow D, Margull A, Berger I, Frommelt L. Prolonged bacterial culture to identify late periprosthetic joint infection: a promising strategy. *Clin Infect Dis*. 2008 Dec 1;47(11):1403-9.
50. Atkins BL, Athanasou N, Deeks JJ, Crook DW, Simpson H, Peto TE, McLardy-Smith P, Berendt AR. Prospective evaluation of criteria for microbiological diagnosis of prosthetic-joint infection at revision arthroplasty. The OSIRIS Collaborative Study Group. *J Clin Microbiol*. 1998 Oct;36(10):2932-9.
51. Prieto-Borja L, Auñón Á, Blanco A, Fernández-Roblas R, Gadea I, García-Cañete J, Parrón R, Esteban J. Evaluation of the use of sonication of retrieved implants for the diagnosis of prosthetic joint infection in a routine setting. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2018 Apr;37(4):715-722.

52. Portillo ME, Salvadó M, Sorli L, Alier A, Martínez S, Trampuz A, Gómez J, Puig L, Horcajada JP. Multiplex PCR of sonication fluid accurately differentiates between prosthetic joint infection and aseptic failure. *J Infect.* 2012 Dec;65(6):541-8.
53. Achermann Y, Vogt M, Leunig M, Wüst J, Trampuz A. Improved diagnosis of periprosthetic joint infection by multiplex PCR of sonication fluid from removed implants. *J Clin Microbiol.* 2010 Apr;48(4):1208-14.
54. Liu K, Fu J, Yu B, Sun W, Chen J, Hao L. Meta-analysis of sonication prosthetic fluid PCR for diagnosing periprosthetic joint infection. *PLoS One.* 2018 Apr 27;13(4)-e0196418.
55. Huang Z, Wu Q, Fang X, Li W, Zhang C, Zeng H, Wang Q, Lin J, Zhang W. Comparison of culture and broad-range polymerase chain reaction methods for diagnosing periprosthetic joint infection: analysis of joint fluid, periprosthetic tissue, and sonicated fluid. *Int Orthop.* 2018 Sep;42(9):2035-2040.
56. Thoendel MJ, Jeraldo PR, Greenwood-Quaintance KE, Yao JZ, Chia N, Hanssen AD, Abdel MP, Patel R. Identification of Prosthetic Joint Infection Pathogens Using a Shotgun Metagenomics Approach. *Clin Infect Dis.* 2018 Oct 15;67(9):1333-1338.
57. Diaz-Ledezma C, Higuera CA, Parvizi J. Success after treatment of periprosthetic joint infection: a Delphi-based international multidisciplinary consensus. *Clin Orthop Relat Res.* 2013 Jul;471(7):2374-82.

58. Narayanan R, Anoushiravani AA, Elbuluk AM, Chen KK, Adler EM, Schwarzkopf R. Irrigation and Debridement for Early Periprosthetic Knee Infection: Is It Effective? *J Arthroplasty*. 2018 Jun;33(6):1872-1878.
59. Romanò CL, Manzi G, Logoluso N, Romanò D. Value of debridement and irrigation for the treatment of peri-prosthetic infections. A systematic review. *Hip Int*. 2012 Jul-Aug;22 Suppl 8:S19-24.
60. Urish KL, Bullock AG, Kreger AM, Shah NB, Jeong K, Rothenberger SD; Infected Implant Consortium. A Multicenter Study of Irrigation and Debridement in Total Knee Arthroplasty Periprosthetic Joint Infection: Treatment Failure Is High. *J Arthroplasty*. 2018 Apr;33(4):1154-1159.
61. Gehrke T, Alijanipour P, Parvizi J. The management of an infected total knee arthroplasty. *Bone Joint J*. 2015 Oct;97-B(10 Suppl A):20-9.
62. Dwyer MK, Damsgaard C, Wadibia J, Wong G, Lazar D, Smith E, Talmo C, Bedair H. Laboratory Tests for Diagnosis of Chronic Periprosthetic Joint Infection Can Help Predict Outcomes of Two-Stage Exchange. *J Bone Joint Surg Am*. 2018 Jun 20;100(12):1009-1015.
63. Chalmers BP, Mabry TM, Abdel MP, Berry DJ, Hanssen AD, Perry KI. Two-Stage Revision Total Hip Arthroplasty With a Specific Articulating Antibiotic Spacer Design: Reliable Periprosthetic Joint Infection Eradication and Functional Improvement. *J Arthroplasty*. 2018 Dec;33(12):3746-3753.

64. Wasielewski RC, Barden RM, Rosenberg AG. Results of different surgical procedures on total knee arthroplasty infections. J Arthroplasty 1996;11-931–938.

65. Falahee MH, Matthews LS, Kaufer H. Resection arthroplasty as a salvage procedure for a knee with infection after a total arthroplasty. J Bone Joint Surg [Am] 1987;69-A-1013–1021.

66. Wu CH, Gray CF, Lee GC. Arthrodesis should be strongly considered after failed two-stage reimplantation TKA. Clin Orthop Relat Res. 2014 Nov;472(11

67. Pring DJ, Marks L, Angel JC. Mobility after amputation for failed knee replacement. J Bone Joint Surg [Br] 1988;70-B-770–771.

68. Bengtson S, Knutson K. The infected knee arthroplasty. A 6-year follow-up of 357 cases. Acta Orthop Scand 1991;62-301–311.

69. Rao N, Crossett LS, Sinha RK, et al. Long-term suppression of infection in total joint arthroplasty.pdf.

70. Hanssen AD, Rand JA. Evaluation and treatment of infection at the site of a total hip or knee arthroplasty. Instr Course Lect 1999;48-111–122. 70.

71. Ellington JK, Reilly SS, Ramp WK, Smeltzer MS, Kellam JF, Hudson MC. Mechanisms of *Staphylococcus aureus* invasion of cultured osteoblasts. *Microb Pathog*. 1999 Jun;26(6):317-23..

72. Hudson MC, Ramp WK, Frankenburg KP. *Staphylococcus aureus* adhesion to bone matrix and bone-associated biomaterials. *FEMS Microbiol Lett*. 1999 Apr 15;173(2):279-84.

73. Bosse MJ, Gruber HE, Ramp WK. Internalization of bacteria by osteoblasts in a patient with recurrent, long-term osteomyelitis. A case report. *J Bone Joint Surg Am*. 2005 Jun;87(6):1343-7.

74. Rutledge B, Huyette D, Day D, Anglen J. Treatment of osteomyelitis with local antibiotics delivered via bioabsorbable polymer. *Clin Orthop Relat Res*. 2003 Jun;(411):280-7.

75. Diefenbeck M, Schrader C, Gras F, Mückley T, Schmidt J, Zankovych S, Boss. Gentamicin coating of plasma chemical oxidized titanium alloy prevents implant-related osteomyelitis in rats. *Biomaterials*. 2016 Sep;101:156-64.

76. Diefenbeck M, Mückley T, Schrader C, Schmidt J, Zankovych S, Bossert J, Jandt KD, Faucon M, Finger U. The effect of plasma chemical oxidation of titanium alloy on bone-implant contact in rats. *Biomaterials*. 2011 Nov;32(32):8041-7.

77. Gallo J, Holinka M, Moucha CS. Antibacterial surface treatment for orthopaedic implants. *Int J Mol Sci*. 2014 Aug 11;15(8)13849-80.
78. Albrektsson T, Johansson C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *Eur Spine J*. 2001 Oct;10 Suppl 2-S96-101.
79. Ochsner PE. Osteointegration of orthopaedic devices. *Semin Immunopathol*. 2011 May;33(3)-245-56.
80. Zhang BG, Myers DE, Wallace GG, Brandt M, Choong PF. Bioactive coatings for orthopaedic implants-recent trends in development of implant coatings. *Int J Mol Sci*. 2014 Jul 4;15(7)-11878-921.
81. Olivares-Navarrete R, Raz P, Zhao G, Chen J, Wieland M, Cochran DL, Chaudhri RA, Ornoy A, Boyan BD, Schwartz Z. Integrin $\alpha 2 \beta 1$ plays a critical role in osteoblast response to micron-scale surface structure and surface energy of titanium substrates. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Oct 14;105(41):15767-72.
82. Lossdörfer S, Schwartz Z, Wang L, Lohmann CH, Turner JD, Wieland M, Cochran DL, Boyan BD. Microrough implant surface topographies increase osteogenesis by reducing osteoclast formation and activity. *J Biomed Mater Res A*. 2004 Sep 1;70(3):361-9.

83. Farzin, A.; Ahmadian, M.; Fathi, M.H. Comparative evaluation of biocompatibility of dense nanostructured and microstructured Hydroxyapatite/Titania composites. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 2013, 33, 2251–2257.
84. Webster, T.J.; Schadler, L.S.; Siegel, R.W.; Bizios, R. Mechanisms of enhanced osteoblast adhesion on nanophase alumina involve vitronectin. *Tissue Eng.* 2001, 7, 291–301.
85. Ryan, G.; Pandit, A.; Apatsidis, D.P. Fabrication methods of porous metals for use in orthopaedic applications. *Biomaterials* 2006, 27, 2651–2670.
86. Wall, I.; Donos, N.; Carlqvist, K.; Jones, F.; Brett, P. Modified titanium surfaces promote accelerated osteogenic differentiation of mesenchymal stromal cells in vitro. *Bone* 2009, 45, 17–26.
87. Eliaz N, Metoki N. Calcium Phosphate Bioceramics: A Review of Their History, Structure, Properties, Coating Technologies and Biomedical Applications. *Materials (Basel)*. 2017 Mar 24;10(4).
88. Ruoslahti, E. RGD and other recognition sequences for integrins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 1996, 12, 697–715.
89. Lentino JR. Prosthetic joint infections: bane of orthopedists, challenge for infectious disease specialists. *Clin Infect Dis.* 2003 May 1;36(9):1157-61. Epub 2003 Apr 14.

90. Prasad K, Bazaka O, Chua M, Rochford M, Fedrick L, Spoor J, Symes R, Tieppo M, Collins C, Cao A, Markwell D, Ostrikov KK, Bazaka K. Metallic Biomaterials- Current Challenges and Opportunities. *Materials (Basel)*. 2017 Jul 31;10(8). pii- E884..
91. Mei S, Wang H, Wang W, Tong L, Pan H, Ruan C, Ma Q, Liu M, Yang H, Zhang L, Cheng Y, Zhang Y, Zhao L, Chu PK. Antibacterial effects and biocompatibility of titanium surfaces with graded silver incorporation in titania nanotubes. *Biomaterials*. 2014 May;35(14):4255-65.
92. Moseke C , Hage F, Vorndran E, Gbureck U. TiO₂ nanotube arrays deposited on Ti substrate by anodic oxidation and their potential as a long-term drug delivery system for antimicrobial agents. *Applied Surface Science* Volume 258, Issue 14, 2012 May 1, 5399-5404
93. Jäger M, Jennissen HP, Dittrich F, Fischer A, Köhling HL. Antimicrobial and Osseointegration Properties of Nanostructured Titanium Orthopaedic Implants. *Materials (Basel)*. 2017 Nov 13;10(11). pii- E1302.
94. Poelstra KA, Barekzi NA, Rediske AM, Felts AG, Slunt JB, Grainger DW. Prophylactic treatment of gram-positive and gram-negative abdominal implant infections using locally delivered polyclonal antibodies. *J Biomed Mater Res*. 2002 Apr;60(1):206-15.

95. Hernández López J.M Funcionalización superficial de aleaciones de titanio mediante anodizado para aplicaciones biomédicas. Universidad Autónoma de Madrid. 2015
96. Rojo L, Barcenilla JM, Vázquez B, González R, San Román J. Intrinsically antibacterial materials based on polymeric derivatives of eugenol for biomedical applications. *Biomacromolecules*. 2008 Sep;9(9):2530-5.
97. An YH, Bradley J, Powers DL, Friedman RJ. The prevention of prosthetic infection using a cross-linked albumin coating in a rabbit model. *J Bone Joint Surg Br*. 1997 Sep;79(5):816-9.
98. Holinka J, Pilz M, Kubista B, Presterl E, Windhager R. Effects of selenium coating of orthopaedic implant surfaces on bacterial adherence and osteoblastic cell growth. *Bone Joint J*. 2013 May;95-B(5):678-82.
99. Lai M, Jin Z, Yan M, Zhu J, Yan X, Xu K. The controlled naringin release from TiO(2) nanotubes to regulate osteoblast differentiation. *J Biomater Appl*. 2018 Nov;33(5):673-680.
100. Li Y, Song Y, Ma A, Li C. Surface Immobilization of TiO(2) Nanotubes with Bone Morphogenetic Protein-2 Synergistically Enhances Initial Preosteoblast Adhesion and Osseointegration. *Biomed Res Int*. 2019 Mar 26;2019:5697250

101. Chernozem RV, Surmeneva MA, Krause B, Baumbach T, Ignatov VP, Prymak O, Loza K, Epple M, Ennen-Roth F, Wittmar A, Ulbricht M, Chudinova EA, Rijavec T, Lapanje A, Surmenev RA. Functionalization of titania nanotubes with electrophoretically deposited silver and calcium phosphate nanoparticles: Structure, composition and antibacterial assay. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2019 Apr;97:420-430.
102. Gallo J, Panacek A, Pucek R, Kriegova E, Hradilova S, Hobza M, Holinka M. Silver Nanocoating Technology in the Prevention of Prosthetic Joint Infection. *Materials (Basel)*. 2016 May 5;9(5). pii: E337.
103. Necula BS, van Leeuwen JP, Fratila-Apachitei LE, Zaat SA, Apachitei I, Duszczak J. In vitro cytotoxicity evaluation of porous TiO₂-Ag antibacterial coatings for human fetal osteoblasts. *Acta Biomater*. 2012 Nov;8(11):4191-7.
104. Muszanska AK, Rochford ET, Gruszka A, Bastian AA, Busscher HJ, Norde W, van der Mei HC, Herrmann A. Antiadhesive polymer brush coating functionalized with antimicrobial and RGD peptides to reduce biofilm formation and enhance tissue integration. *Biomacromolecules*. 2014 Jun 9;15(6):2019-26.
105. Horowitz SM, Gautsch TL, Frondoza CG, Riley L Jr. Macrophage exposure to polymethyl methacrylate leads to mediator release and injury. *J Orthop Res*. 1991 May;9(3):406-13.

106. Esteban J, Gadea I, Pérez-Jorge C, Sandoval E, García-Cañete J, Fernandez-Roblas R, Blanco A, Prieto-Borja L, Cordero-Ampuero J. Diagnosis of spacer-associated infection using quantitative cultures from sonicated antibiotics-loaded spacers: implications for the clinical outcome. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2016 Feb;35(2):207-13.
107. Inzana JA, Schwarz EM, Kates SL, Awad HA. A novel murine model of established Staphylococcal bone infection in the presence of a fracture fixation plate to study therapies utilizing antibiotic-laden spacers after revision surgery. *Bone*. 2015 Mar;72:128-36.
108. McLaren AC. Alternative materials to acrylic bone cement for delivery of depot antibiotics in orthopaedic infections. *Clin Orthop Relat Res*. 2004 Oct;(427)-101-6.
109. Hashizume H, Tamaki T, Oura H, Minamide A. Changes in the extracellular matrix on the surface of sintered bovine bone implanted in the femur of a rabbit: an immunohistochemical study. *J Orthop Sci*. 1998;3(1):42-53.
110. Wachol-Drewiek Z, Pfeiffer M, Scholl E. Comparative investigation of drug delivery of collagen implants saturated in antibiotic solutions and a sponge containing gentamicin. *Biomaterials*. 1996 Sep;17(17):1733-8.

111. Lin SS, Ueng SW, Liu SJ, Chan EC, Chao EK, Tsai CH, Chen KT, Wei FC, Shih CH. Development of a biodegradable antibiotic delivery system. Clin Orthop Relat Res. 1999 May;(362)-240-50.

112. Whiteside LA, Roy ME, Nayfeh TA. Intra-articular infusion: a direct approach to treatment of infected total knee arthroplasty. Bone Joint J. 2016 Jan;98-B(1 Suppl A):31-6.

113. Schilling A, Neuner E, Rehm SJ. Vancomycin- a 50-something-year-old antibiotic we still don't understand. Cleve Clin J Med. 2011 Jul;78(7)-465-71.

114. Perry CR, Hulsey RE, Mann FA, Miller GA, Pearson RL. Treatment of acutely infected arthroplasties with incision, drainage, and local antibiotics delivered via an implantable pump. Clin Orthop Relat Res. 1992 Aug;(281)-216-23.

115. Arenas MA, Pérez-Jorge C, Conde A, Matykina E, Hernández-López JM, Esteban J. Doped TiO₂ anodic layers of enhanced antibacterial properties. Colloids Surf B Biointerfaces. 2013 May 1;105-106-12..

116. Matykina, E., Hernandez-López, J.M., Conde, A., Domingo, C., de Damborenea, J.J., Arenas, M.A., 2011. Morphologies of nanostructured TiO₂ doped with F on Ti– 6Al–4 V alloy. Electrochim. Acta 56, 2221–2229.

117. Hernández-López, J.M., Conde, A., de Damborenea, J.J., Arenas, M.A., 2014. TiO₂ nanotubes with tunable morphologies. *RSC Adv.* 4, 62576–62585
118. Doadrio AL, Conde A, Arenas MA, Hernández-López JM, de Damborenea JJ, Pérez-Jorge C, Esteban J, Vallet-Regí M. Use of anodized titanium alloy as drug carrier: Ibuprofen as model of drug releasing. *Int J Pharm.* 2015 Aug 15;492(1-2):207-12.
119. Aguilera-Correa JJ, Doadrio AL, Conde A, Arenas MA, de-Damborenea JJ, Vallet-Regí M, Esteban J. Antibiotic release from F-doped nanotubular oxide layer on Ti6AL4V alloy to decrease bacterial viability. *J Mater Sci Mater Med.* 2018 Jul 20;29(8):118.
120. Doadrio AL, Salinas AJ, Sánchez-Montero JM, Vallet-Regí M. Drug release from ordered mesoporous silicas. *Curr Pharm Des.* 2015;21(42):6213-819.
121. Frutos Cabanillas P, Díez Peña E, Barrales-Rienda JM, Frutos G. Validation and in vitro characterization of antibiotic-loaded bone cement release. *Int J Pharm.* 2000 Nov 19;209(1-2):15-26.
122. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001 May 1;29(9):e45.
123. Cordero J, Munuera L, Folgueira MD. Influence of bacterial strains on bone infection. *J Orthop Res.* 1996 Jul;14(4):663-7.

124. Popat KC, Eltgroth M, LaTempa TJ, Grimes CA, Desai TA. Titania nanotubes: a novel platform for drug-eluting coatings for medical implants? *Small*. 2007 Nov;3(11):1878-81.
125. Feng W, Geng Z, Li Z, Cui Z, Zhu S, Liang Y, Liu Y, Wang R, Yang X. Controlled release behaviour and antibacterial effects of antibiotic-loaded titania nanotubes. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2016 May;62:105-12.
126. Gulati K, Aw MS, Losic D. Drug-eluting Ti wires with titania nanotube arrays for bone fixation and reduced bone infection. *Nanoscale Res Lett*. 2011 Oct 31;6:571.
127. Antoci V Jr, Adams CS, Parvizi J, Ducheyne P, Shapiro IM, Hickok NJ. Covalently attached vancomycin provides a nanoscale antibacterial surface. *Clin Orthop Relat Res*. 2007 Aug;461:81-7.
128. Zhang H, Sun Y, Tian A, Xue XX, Wang L, Alquhali A, Bai X. Improved antibacterial activity and biocompatibility on vancomycin-loaded TiO₂ nanotubes: in vivo and in vitro studies. *Int J Nanomedicine*. 2013;8:4379-89.
129. Kazemzadeh-Narbat M, Lai BF, Ding C, Kizhakkedathu JN, Hancock RE, Wang R. Multilayered coating on titanium for controlled release of antimicrobial peptides for the prevention of implant-associated infections. *Biomaterials*. 2013 Aug;34(24):5969-77.

130. Lin WT, Tan HL, Duan ZL, Yue B, Ma R, He G, Tang TT. Inhibited bacterial biofilm formation and improved osteogenic activity on gentamicin-loaded titania nanotubes with various diameters. *Int J Nanomedicine*. 2014 Mar 7;9:1215-30.
131. Doadrio AL, Sánchez-Montero JM, Doadrio JC, Salinas AJ, Vallet-Regí M. Mesoporous silica nanoparticles as a new carrier methodology in the controlled release of the active components in a polypill. *Eur J Pharm Sci*. 2017 Jan 15;97:1-8.
132. Graham AE, Speicher E, Williamson B. Analysis of gentamicin sulfate and a study of its degradation in dextrose solution. *J Pharm Biomed Anal*. 1997 Jan;15(4):537-43.
133. Mullins ND, Deadman BJ, Moynihan HA, McCarthy FO, Lawrence SE, Thompson J, Maguire AR. The impact of storage conditions upon gentamicin coated antimicrobial implants. *J Pharm Anal*. 2016 Dec;6(6):374-381.
134. Melichercik P, Klapkova E, Landor I, Judl T, Sibek M, Jahoda D. The effect of Vancomycin degradation products in the topical treatment of osteomyelitis. *Bratisl Lek Listy*. 2014;115(12):796-9.
135. Lozano D, Hernández-López JM, de Damborenea J, Esteban J, Pérez-Jorge C, Pérez-Tanoira R, Conde A. Influence of the nanostructure of F-doped TiO₂ films on osteoblast growth and function. *J Biomed Mater Res A*. 2015 Jun;103(6):1985-90.

136. Decreased Staphylococcus epidermis adhesion and increased osteoblast functionality on antibiotic-loaded titania nanotubes. Biomaterials. 2007 Nov;28(32):4880-8.
137. Bori G, Muñoz-Mahamud E, Garcia S, Mallofre C, Gallart X, Bosch J, Garcia E, Riba J, Mensa J, Soriano A. Interface membrane is the best sample for histological study to diagnose prosthetic joint infection. Mod Pathol. 2011 Apr;24(4):579-84.
138. Willie BM, Yang X, Kelly NH, Han J, Nair T, Wright TM, van der Meulen MC, Bostrom MP. Cancellous bone osseointegration is enhanced by in vivo loading. Tissue Eng Part C Methods. 2010 Dec;16(6):1399-406.
139. Mavrogenis AF, Dimitriou R, Parvizi J, Babis GC. Biology of implant osseointegration. J Musculoskelet Neuronal Interact. 2009 Apr-Jun;9(2):61-71.
140. Mello ASdS, Santos PLd, Marquesi A, et al. 2016. Some aspects of bone remodeling around dental implants. Revista Clínica de Periodoncia, Implantología y Rehabilitación Oral <https://doi.org/10.1016/j.piro.2015.12.001>
141. Noble ML, Mourad PD, Ratner BD. Digital Drug Delivery: On-Off Ultrasound Controlled Antibiotic Release from Coated Matrices with Negligible Background Leaching. Biomater Sci. 2014 Jun 1;2(6):839-902.

142. Aquino RP, Auriemma G, Mencherini T, et al. 2013. Design and production of gentamicin/dextran microparticles by supercritical assisted atomisation for the treatment of wound bacterial infections. *Int J Pharm* 440:188–194.
143. Shukla A, Fang JC, Puranam S, et al. 2012. Release of vancomycin from multilayer coated absorbent gelatin sponges. *J Control Release* 157:64–71.
144. Li D, Lv P, Fan L, et al. 2017. The immobilization of antibiotic-loaded polymeric coatings on osteoarticular Ti implants for the prevention of bone infections. *Biomater Sci* 5:2337–2346.
145. Radin S, Campbell JT, Ducheyne P, et al. 1997. Calcium phosphate ceramic coatings as carriers of vancomycin. *Biomaterials* 18:777–782.
146. Cabal B, Alou L, Cafini F, et al. 2014. A new biocompatible and antibacterial phosphate free glass-ceramic for medical applications. *Sci Rep* 4:5440.
147. Jennings JA, Carpenter DP, Troxel KS, et al. 2015. Novel Antibiotic-loaded point-of-care implant coating inhibits bio film. *Clin Orthop Relat Res* 473:2270–2282.
148. Hansen EN, Adeli B, Kenyon R, et al. 2014. Routine use of antibiotic laden bone cement for primary total knee arthroplasty: impact on infecting microbial patterns and resistance profiles. *J Arthroplasty* 29:1123–1127.

149. Wang J, Zhu C, Cheng T, et al. 2013. A systematic review and meta-analysis of antibiotic-impregnated bone cement use in primary total hip or knee arthroplasty. PLoS ONE 8:e82745.

150. Sousa R, Abreu MA. 2018. Treatment of prosthetic joint infection with debridement, antibiotics and irrigation with implant retention—a narrative review. J Bone Jt Infect 3:108–117.

151. Charette RS, Melnic CM. 2018. Two-stage revision arthroplasty for the treatment of prosthetic joint infection. Curr Rev Musculoskelet Med 11:332–340.

152. Rowan FE, Donaldson MJ, Pietrzak JR, et al. 2018. The role of one-stage exchange for prosthetic joint infection. Curr Rev Musculoskelet Med 11:370–379